

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA

**PLASTICIDAD DE LA SINAPSIS INHIBITORIA  
REGULADA POR ACETILCOLINA Y  
ENDOCANNABINOIDE EN HIPOCAMPO.**

Tesis Doctoral

M<sup>a</sup> Soledad Domínguez Escribano

Madrid 2012

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>Sinapsis y Plasticidad sináptica. ....</b>	<b>8</b>
<b>Trasmisión GABAérgica. ....</b>	<b>10</b>
Los receptores GABA <sub>A</sub> .....	10
Mecanismos iónicos de la inhibición GABA <sub>A</sub> .....	15
Los receptores GABA <sub>B</sub> .....	16
Interneuronas inhibitorias GABAérgicas del hipocampo.....	18
<b>La transmisión colinérgica en Hipocampo. ....</b>	<b>18</b>
<b>Liberación de Neurotransmisor.....</b>	<b>19</b>
<b>Consecuencias funcionales de la activación de receptores para endocannabinoides.....</b>	<b>21</b>
<b>La i-LTD. ....</b>	<b>22</b>
<b>Receptores de membrana en interneuronas de Hipocampo. ....</b>	<b>23</b>
<b>El Ritmo Theta en Hipocampo. ....</b>	<b>24</b>
<b>Importancia funcional de la plasticidad sináptica de la inhibición. ....</b>	<b>25</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>1. Hipocampo como modelo experimental.....</b>	<b>30</b>
<b>2. Obtención y preparación de las rodajas de hipocampo.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Técnica de registro.....</b>	<b>32</b>
3.1. Identificación de las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo.....	32
3.2. Registros electrofisiológicos.....	34
3.2.1. Soluciones intracelulares.....	35
3.2.1.1. Solución intracelular con 10 mM Cl <sup>-</sup> .....	35
3.2.1.2. Solución intracelular con 110 mM de Cl <sup>-</sup> .....	36
3.2.1.3. Solución intracelular con 1 mM de Cl <sup>-</sup> .....	36
3.2.2. Estimulación eléctrica.....	36
3.2.3. Protocolos.....	37
3.2.3.1. Protocolo emulando el ritmo theta en condiciones de fijación de voltaje.....	37
3.2.3.2. Protocolo de despolarizaciones sucesivas en condiciones de fijación de voltaje.....	38
3.2.3.3. Protocolo TBS en fijación de corriente.....	39
3.2.3.4. Protocolos para determinar el potencial de reversión del Cl <sup>-</sup> y la dependencia de voltaje de los IPSCs.....	39

3.2.4. Aplicación de ACh por microiontoforesis.....	40
3.2.5. Aplicación de GABA mediante pulso de presión.....	40
<b>4. Análisis farmacológico.....</b>	<b>41</b>
4.1 Reactivos suministrados en el baño. ....	41
4.2 Reactivos aplicados intracelularmente. ....	42
4.3 Casas comerciales suministradoras de los reactivos empleados. ....	43
<b>5. Procesamiento de los resultados. ....</b>	<b>43</b>
5.1 Análisis de los resultados. ....	43
5.1.1. Amplitud del pico de la señal. ....	44
5.1.2. Medida de la Tau del IPSC. ....	44
5.1.3. Cambios en la respuesta por pares de pulsos (PPR). ....	44
5.2 Análisis estadístico.....	45
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>1. PLASTICIDAD DE LA SINAPSI INHIBITORIA.....</b>	<b>47</b>
1.1. Caracterización de los IPSCs registrados.....	47
1.2. Estudio de los efectos combinados del protocolo TBS y la aplicación de ACh.....	48
1.3. Efectos de las despolarizaciones sucesivas y de la ACh sobre los IPSCs. ....	51
1.4 La concentración intracelular del ión Cl <sup>-</sup> no influye sobre esta plasticidad sináptica. ....	53
1.5. La activación de las sinapsis inhibitorias es necesaria para la inducción de la LTP GABAérgica, pero no para su mantenimiento. ....	56
1.6. La actividad combinada de ACh y Despolarización modifica los IPSC a través de receptores GABA <sub>A</sub> . ....	57
1.7. Los efectos combinados de ACh y Despolarización requieren la activación M1-mAChRs, pero no de M2-mAChRs ni α7-nAChRs. ....	59
1.8. El efecto combinado de ACh y Despolarización requiere un aumento del Ca <sup>2+</sup> intracelular. ....	61
1.9. La potenciación GABAérgica induce voltaje dependencia de los IPSCs. ....	63
1.9.1. La voltaje dependencia de los IPSCs se debe al aumento de calcio intracelular. ....	66
1.10. Mecanismos intracelulares que contribuyen a la GABA <sub>A</sub> -LTP. ....	67
1.11. Inserción de nuevos receptores GABA <sub>A</sub> y/o traslocación de receptores extrasinápticos. ....	69
1.11.1. La acción combinada de ACh y Despolarización no induce la inserción de receptores GABA <sub>A</sub> transportados por vesículas. ....	70
1.11.2. La acción combinada de ACh y Despolarización produce el desplazamiento de receptores GABA <sub>A</sub> extrasinápticos hacia la sinapsis. ....	72
1.12. ¿Es fisiológico este tipo de plasticidad mediada por la acción combinada de ACh y despolarización?.....	74
<b>2. SUPRESIÓN DE LA DSI Y APARICIÓN DE UN NUEVO FENÓMENO, LA FID. 77</b>	
2.1. Efectos del bloqueo de los receptores CB1:.....	80

2.2. Las interneuronas CCK <sup>+</sup> median en este fenómeno plástico generado por ACh y Despolarización. ....	83
2.3. Los efectos de ACh y Despolarización sobre la DSI y la FID requieren un aumento de la concentración intracelular de Ca <sup>2+</sup> . ....	85
<b>3. DISTINCIÓN ENTRE EL COMPONENTE PRESINÁPTICO y EL POSTSINÁPTICO.....</b>	<b>88</b>
3.1. La aplicación de GABA actúa directamente sobre los receptores GABA <sub>A</sub> aislando los componentes postsinápticos de la potenciación. ....	88
3.1.1. Durante la potenciación de la corriente GABA aparece una voltaje dependencia. ....	90
3.2. La corriente GABA no se modifica en presencia de AM-251. ....	91
3.3. La corriente GABA es bloqueada por BAPTA intracelular. ....	92
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>94</b>
1. Los efectos de la activación de receptores colinérgicos sobre la eficacia de las sinapsis GABA <sub>A</sub> dependen de la actividad postsináptica. ....	95
2. El aumento de la concentración de calcio intracelular modifica el número y las propiedades de los recetores GABA <sub>A</sub> sinápticos. ....	98
3. Efecto de la activación de los receptores eCBs sobre la plasticidad y la efectividad sináptica de la transmisión GABAérgica monosináptica. ....	99
4. La GABA <sub>A</sub> -LTP es un fenómeno potencialmente fisiológico con importantes consecuencias funcionales. ....	101
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>102</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>104</b>

## **ABREVIATURAS**

**2 AG:** 2-Acilglicerol

**$\alpha 7$ -nAChR:** Receptores nicotínicos colinérgicos que poseen la subunidad  $\alpha 7$ .

**AC:** Del inglés *Action current*. Corriente de acción.

**ACh:** Acetilcolina.

**Akt:** Tipo de proteína serin-treonina quinasa, también conocida como quinasa B.

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico.

**AP:** Del inglés *Action potential*. Potencial de acción.

**BZ:** Benzodiazepinas.

**CA1:** Nombre propio de una región de Hipocampo.

**CaMKII:**  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina Proteína Kinasa II.

**CB<sub>1</sub>Rs:** Receptores para endocannabinoides tipo 1.

**CC:** Del inglés *Current Clamp*. Fijación de corriente.

**CCCs:** Del inglés: *neuronal cation-chloride cotransporters*. Cotransportadores de cationes.

**CCK<sup>+</sup>:** Interneuronas Colecistoquinina Positivas.

**CP:** Del inglés: *Pyramidal cell*. Célula piramidal.

**DAG:** Diacilglicerol.

**D-AP5:** Ácido D-2-amino-5-fosfoalérico.

**DGL:** Diacilglicerol Lipasa.

**DSI:** Del inglés: *Depolarization-induced suppression of inhibition*. La Despolarización produce una supresión de la inhibición.

**eCBs:** Endocannabinoides.

**FID:** Del inglés *Facilitation of inhibition by depolarization*. Facilitación de la inhibición por despolarización.

**GABA:** Ácido  $\gamma$ -amino-n-Butírico.

**GABA<sub>A</sub>R:** Receptor GABA tipo A.

**GABA<sub>B</sub>R:** Receptor GABA tipo B.

**GDP $\beta$ S:** Del inglés: *Guanosine 5'-[ $\beta$ -thio]diphosphate*. Guanosina 5'-[ $\beta$ -thio]difosfato.

**IP<sub>3</sub>:** Inositol Trifosfato.

**IP<sub>3</sub>R:** Receptores de IP<sub>3</sub> (se localizan en el retículo endoplasmático).

**IPSC:** Del inglés: *Inhibitory Postsynaptic Current*. Corriente Inhibitoria Postsináptica.

**IPSP:** Del inglés: *Inhibitory Postsynaptic Potential*. Potencial Inhibitorio Postsináptico.

**LCA:** Líquido cefalorraquídeo artificial.

**LTD:** Del inglés: *Long term potentiation*. Potenciación a largo plazo.

**LTP:** Del inglés: *Long term depression*. Depresión a largo plazo.

**M1-mAChRs:** Receptores muscarínicos colinérgicos tipo 1.

**M2-mAChRs:** Receptores muscarínicos colinérgicos tipo 2.

**mAChRs:** Receptores muscarínicos colinérgicos.

**nAChRs:** Receptores nicotínicos colinérgicos.

**NMDA:** Ácido N-metil-D-Aspártico.

**NMDAR:** Receptores ionotrópicos sensibles a NMDA.

**NT:** Neurotransmisor.

**PIP2:** Fosfoinositoldifosfato.

**PiTX:** Picrotoxina.

**PKA:** Del inglés *Protein kinase A*. Proteína quinasa A.

**PKC:** Del inglés *Protein kinase C*. Proteína quinasa C .

**PLC:** Fosfolipasa C.

**PP1 $\alpha$ :** Fosfoproteína fosfatasa 1 $\alpha$ .

**PP2A:** Fosfoproteína fosfatasa 2A.

**PPF:** Del Inglés: *Paired Pulse Facilitation*. Facilitación por pares de pulsos.

**PV<sup>+</sup>:** Interneuronas Parvoalbúmina Positivas.

**SC:** Del inglés: *Schaffer collaterals*. Colaterales de Schaffer.

**SR:** *Stratum Radiatum*.

**STD:** Del inglés: *Short Term Depression*. Depresión a corto plazo.

**STP:** Del inglés: *Short Term Potentiation*. Potenciación a corto plazo.

**TBS:** Del inglés *Theta Burst Stimulation*. Estimulación tetánica.

**VC:** Del inglés: *Voltage Clamp*. Fijación de voltaje.

**VGCCs:** Del inglés *Voltage-Gated Calcium Channels*. Canales de Calcio Voltaje Dependientes.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **Sinapsis y Plasticidad sináptica.**

El sitio en el que se comunica una neurona con otra recibe el nombre de sinapsis y la transmisión sináptica resulta fundamental para que el funcionamiento del sistema nervioso, interviniendo en procesos como la percepción, el movimiento voluntario y el aprendizaje.

El término sinapsis fue acuñado por Sherrington en 1897, con las palabras griegas *sin-*, que significa “juntos”, y *haptaina*, que quiere decir “con firmeza” y hace referencia a la región anatómica donde el terminal axónico de la neurona presináptica contacta con la neurona postsináptica, aunque su significado se ha ido ampliando hasta incluir los contactos funcionales entre neuronas y efectores como el contacto sobre las células musculares conocido como unión neuromuscular.

El sistema nervioso tiene la capacidad de modificar sus sinapsis, regulando así sus circuitos neuronales de acuerdo a las necesidades y requerimientos a los que se enfrenta el organismo; fenómeno que se conoce como **Plasticidad Sináptica**. Los procesos de aprendizaje y memoria se consideran asociados al mecanismo de **Plasticidad Sináptica**.

En 1904, **Santiago Ramón y Cajal** fue el primero en sugerir que las variaciones en el número y efectividad de las conexiones sinápticas son la base física del aprendizaje y soporte de la memoria. Esta idea fue concretada en 1949 por **Donald Hebb** (Hebb, 1949), quien propuso que la coincidencia de la actividad pre- y postsináptica podría modificar, durante períodos prolongados, las conexiones neuronales aumentando su efectividad sináptica, lo que se llamó **potenciación sináptica a largo plazo** (en inglés *Long Term Potentiation* y se conoce por sus siglas, **LTP**) (Bliss y Lomo, 1973), pero también la efectividad sináptica se puede ver disminuida y



en este caso hablaríamos de **LTD** (del inglés *Long Term Depression*) que significa depresión a largo plazo (Kirkwood y col., 1993). Además, tanto la potenciación como la depresión pueden ser de corta duración y se habla STP y STD (del inglés *Short Term Potentiation* y *Short Term Depression*).

Posteriormente se demostró que la activación de receptores de NMDA era necesaria para la inducción de este tipo *hebbiano* de potenciación sináptica. (Collingridge y col., 1983).

Desde entonces se han descrito diferentes formas de potenciación a largo plazo de tipo *hebbiano* en distintas estructuras cerebrales como la neocorteza y el hipocampo (Debanne y col., 1996; Markram et al., 1997; Magee and Johnston, 1997), en las células granulares de la vía perforante (McNaughton and Barnes, 1977) y la corteza cerebral (Sjöström et al., 2001). También se han descrito fenómenos de potenciación no *hebbiana*, en los que la coincidencia pre- postsináptica y de la activación de receptores de NMDA no es necesaria, como el descrito por Fernández de Sevilla y col (2008) que implica a la acetilcolina (ACh) y a los receptores de inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>) de los reservorios intracelulares de calcio.

Tradicionalmente la LTP de la sinapsis excitadora glutamatérgica ha sido ampliamente estudiada, en cambio la aportación de la sinapsis GABAérgica al proceso es poco conocida. La existencia del neurotransmisor (NT) GABA en el cerebro garantiza el equilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal, así como el correcto funcionamiento del sistema, estando implicado en la regulación de procesos como la actividad circuital, el aprendizaje, la memoria y en el control de posibles funcionamientos anómalos del sistema que pueden derivar en la manifestación de epilepsias (Bradford, 1995; Gale, 1992; Federico y MacVicar, 1996; Martín y col.,

2001; Cossart y col., 2005; Fritschy, 2008) , alteraciones de la nocicepción; (Schuler y col., 2001; Enna y McCarron, 2006; Potes y col., 2006) ser causa de adicciones, como por ejemplo al alcohol (Mihic y Harris, 1996; Wei y col., 2004; Wallner y col., 2006) o a otros tipos de drogas (Roberts y col., 1996; Bowery, 2006), ansiedad (Lydiard, 2003; Jacobson y Cryan, 2008), trastornos del sueño (Wafford y Ebert, 2006) depresión (Mombereau y col., 2004), trastorno bipolar (Craddock y col., 2010) o esquizofrenia (Charych y col., 2009).

### **Trasmisión GABAérgica.**

El aminoácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el NT de tipo inhibitor más abundante en el sistema nervioso central, sintetizado a partir del ácido glutámico por la enzima ácido glutámico-descarboxilasa (GAD) y metabolizado por la GABA-transaminasa (GABA-T). (Flórez, 2003; Enna, 2007).

Existen dos tipos de receptores para el GABA, los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. Los receptores GABA<sub>A</sub> median respuestas sinápticas rápidas mientras que los GABA<sub>B</sub> participan en las respuestas sinápticas lentas.

### **Los receptores GABA<sub>A</sub>.**

Los receptores GABA<sub>A</sub> son del tipo inotrópico y pertenecen a la superfamilia de canales iónicos formados por proteína heteropentamérica activada por ligando tipo *lazo de cisteína* entre los que se encuentran los receptores nicotínicos para ACh y los receptores inotrópicos para glutamato, glicina y 5HT<sub>3</sub> (Unwin, 1989; Barnard y col., 1998; Luscher y col., 2011).

Las cinco subunidades de estos receptores se ensamblan formando un poro o canal iónico. Cada subunidad consta de: (i) un extremo N-terminal extracelular; (ii) cuatro dominios transmembrana (M1-4); (iii) una extensa región entre M3 y M4 que

forma un asa intracelular de cisteínas y; *(iv)* un extremo C-terminal extracelular, después de M4. (Luscher y col., 2011). La distribución espacial de cada una de la subunidades determina que el dominio M2 constituya el canal o poro iónico donde la carga eléctrica condiciona el paso de iones.

El asa o lazo de cisteínas comprendido entre M3 y M4 es el lugar de unión de diversos factores de señalización como *(i)* las enzimas quinasas: PKC (Proteína quinasa C), PKA (Proteína quinasa A), CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina Proteína Kinasa II), Akt; (Un tipo de proteína serin-treonina quinasa, también conocida como quinasa B). y *(ii)* las enzimas fosfatasas tipo PP1 $\alpha$  (Fosfoproteína fosfatasa 1), PP2A (Fosfoproteína fosfatasa 2A), la calcineurina o proteínas como la gefirina, encargada de anclar el receptor al citoesqueleto (McDonald y col., 1998; Brandon y col., 1999; Wang y col., 2003; Alldred y col., 2005; Houston y col., 2007).

Las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> están codificadas por 19 genes diferentes que a su vez se distinguen en ocho subclases según sea la homología de sus secuencias:  $\alpha$  1-6,  $\beta$  1-3,  $\gamma$  1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  y  $\rho$  1-3 (Olsen y Sieghart, 2008). Las principales combinaciones de receptores nativos para GABA<sub>A</sub> son:  $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$ ,  $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ,  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ , siendo  $\beta$  el sitio de reconocimiento para el agonista (Ymer y col., 1989; Whiting, 2003). Hay otras subunidades como  $\alpha$ ,  $\gamma$   $\delta$  que poseen características distintas a las que se hará referencia más adelante.

Los receptores GABA<sub>A</sub> son antagonizados de forma competitiva por el alcaloide Bicuculina, y de forma alostérica por los convulsionantes picrotoxina y gabazine (SR-95531). También existen diversos insecticidas que impiden el paso del ión Cl<sup>-</sup> a través de su canal (Ueno y col., 1997; Flórez, 2003). Los agonistas más importantes de dichos receptores son el GABA y muscimol. Además, los receptores GABA<sub>A</sub> son modulados

por: barbitúricos, benzodiacepinas, esteroides y etanol, por lo que estos receptores tienen **gran importancia médica ya que interaccionan con numerosos fármacos de uso clínico con propiedades ansiolíticas, anticonvulsionantes, relajantes musculares o sedativas y con drogas de uso y abuso** (Flórez, 2003). Cada uno de estos moduladores interactúa alostéricamente con uno o más de los restantes, facilitando o inhibiendo la apertura del canal de  $\text{Cl}^-$ . La acción farmacológica de algunos de estos compuestos, además de realizarse con su sitio específico, se lleva a cabo en otros sitios del complejo  $\text{GABA}_A$  o interfiere en la actividad de otros canales, como los **barbitúricos**, que pueden unirse a otros sitios del complejo o incluso interferir en la actividad de otros canales, como por ejemplo, los de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los **barbitúricos** actúan en función de concentración, ya que a concentraciones bajas prolongan el tiempo que el canal permanece abierto por acción del GABA, mientras que a dosis altas abren directamente el canal aún en ausencia de GABA. (Flórez, 2003).

Otro modulador alostérico son las **benzodiacepinas**, que aumentan la frecuencia de apertura del canal en respuesta a GABA. La unión de las benzodiacepinas tiene lugar entre las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\gamma 2$  es esencial en la formación del complejo receptor  $\text{GABA}_A$ -benzodiacepínico. Las técnicas de hibridación *in situ* han demostrado que la subunidad  $\gamma 2$  se expresa, junto con la  $\alpha$  y la  $\beta$ , en los grupos neuronales ricos en sitios benzodiacepínicos de alta afinidad y la sustitución de  $\gamma 2$  implica una pérdida total de afinidad del complejo por las benzodiacepinas.

Existe otro tipo de subunidad, la  $\delta$ , que es insensible a agonistas benzodiacepínicos (Shivers y col., 1989; Benke y col., 1991; Nusser y Mody, 2002) (Cope y col., 2005; Brickley y Mody, 2012), pero altamente sensible al súper agonista 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c] pyridine-3-ol (THIP/gaboxadol) (Brown y col., 2002; Wohlfarth y col., 2002). Cuando la subunidad  $\delta$  aparece asociada a  $\alpha$  y  $\beta$  nos

encontramos ante receptores GABA<sub>A</sub> que no están asociados a fijación de benzodiazepinas (Rudolph y Knoflach, 2011).

Los receptores GABA<sub>A</sub> que expresan la subunidad  $\gamma 2$  son tanto sinápticos como extrasinápticos mientras que los que expresan la subunidad  $\delta$  son exclusivamente extrasinápticos.

Como se mencionó anteriormente, los receptores GABA<sub>A</sub> median respuestas sinápticas rápidas, existiendo dos tipos de respuestas rápidas mediadas por estos receptores: *(i) fásica o sináptica* y; *(ii) tónica o extrasináptica*. La **respuesta fásica** consiste en un rápido y preciso potencial postsináptico inhibitorio, de corta latencia y pocos milisegundos de duración que es generado por la activación los receptores GABA<sub>A</sub> de baja afinidad. Estos receptores GABA<sub>A</sub> son activados a altas concentraciones y de manera transitoria por el GABA liberado en la sinapsis. (Banks y Pearce, 2000; Szabadics y col., 2007).

La **inhibición fásica** es debida a la activación de receptores que contienen las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  asociadas a la subunidad ubicua  $\gamma 2$  ( $\alpha_1\beta_{2/3}\gamma 2$ ,  $\alpha_2\beta_{2/3}\gamma 2$  y  $\alpha_3\beta_{2/3}\gamma 2$ ). Las **interneuronas de hipocampo presentan  $\alpha_1\beta\gamma 2$**  (Farrant y Nusser, 2005; Brickley y Mody, 2012).

La **inhibición tónica** del receptor GABA<sub>A</sub> se caracteriza por un efecto espacio-temporal menos preciso, generado por la activación de receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad (activados a bajas concentraciones de GABA) y que no se desensibilizan. Estas características les confieren funciones especialmente críticas en la regulación de la excitabilidad en diversos en circuitos neuronales (Somogyi y col., 1989; Soltesz y col., 1990; Banks y Pearce, 2000).

La **inhibición tónica** coincide con la expresión de determinadas subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, concretamente  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  y  $\delta$  ( $\alpha_6\beta_x\delta$ ,  $\alpha_4\beta_x\delta$  y  $\alpha_5\beta_x\gamma_2$ ), en **células piramidales de CA1 de hipocampo encontramos la  $\alpha_5\beta\gamma_2$**  (Brickley y Mody, 2012). La presencia de la subunidad  $\delta$  en receptores recombinantes transmite propiedades ideales para la generación de inhibición tónica, es decir, la activación por concentraciones bajas de GABA (Saxena y Macdonald, 1994; Haas y Macdonald, 1999; Bianchi y Macdonald, 2002; Semyanov y col., 2004; Glykys y Mody, 2007).

Se ha demostrado que la difusión lateral de los receptores extrasinápticos GABA<sub>A</sub> y su difusión a la sinapsis es el mecanismo clave en la génesis de **Plasticidad Sináptica inhibitoria**. Se ha visto que la liberación de GABA satura los receptores GABA<sub>A</sub> postsinápticos lo que tiene como consecuencia que las modificaciones en la eficacia sináptica de la inhibición GABAérgica sean el resultado de cambios en el número de receptores GABA<sub>A</sub> (Nusser y col., 1997; Rannals y Kapur, 2011). Cambios en el número de receptores GABA<sub>A</sub> en la sinapsis pueden ser causados por: *(i)* difusión lateral a la sinapsis de los receptores extrasinápticos preexistentes (Bogdanov y col., 2006; Jacob y col., 2008; Bannai y col., 2009, Saliba y col., 2009; revisado en Luscher y col., 2011) *(ii)* la inserción en la sinapsis de los nuevos receptores GABA<sub>A</sub> transportados a la membrana sináptica por endosomas (Luscher y col., 2011) y *(iii)* una disminución en la tasa de internalización de receptores GABA<sub>A</sub> (Rannals y Kapur, 2011) Además modificaciones biofísicas de los receptores GABA<sub>A</sub> preexistentes en la sinapsis, como por ejemplo modificación de la sensibilidad a GABA, pueden también participar (Ormond y Woodin, 2011).

**Mecanismos iónicos de la inhibición GABA<sub>A</sub>.**

La activación del receptor GABA<sub>A</sub> produce una entrada del ión Cl<sup>-</sup> en la célula que induce una hiperpolarización postsináptica debida a que normalmente en animales adultos el potencial de equilibrio del ión Cl<sup>-</sup> (ECl<sup>-</sup>) es negativo con respecto al potencial de membrana en reposo. Sin embargo, en determinadas regiones del sistema nervioso, así como durante el desarrollo, la activación del receptor GABA<sub>A</sub> puede producir una despolarización.

Esta despolarización es debida que las neuronas inmaduras expresan el cotransportador NKCC1, que utilizando el gradiente de Na<sup>+</sup> induce el influjo de Cl<sup>-</sup>, modificándose el potencial de equilibrio del ión Cl<sup>-</sup> que adquiere valores más despolarizados que el potencial de reposo. En estas condiciones la activación del receptor GABA<sub>A</sub> genera la salida de Cl<sup>-</sup>, despolarizando a la neurona, pudiendo tener GABA un efecto excitador siempre que el potencial de equilibrio de Cl<sup>-</sup> supere el nivel de disparo de la neurona (Blaesse y col., 2009).

Por el contrario, cuando las neuronas maduran, se produce la aparición del cotransportador KCC2 en la membrana celular (a menudo coexpresado con el KCC3) lo que trae como consecuencia la salida del ión Cl<sup>-</sup>, modificándose el potencial de equilibrio de dicho ión que adquiere valores mas hiperpolarizados que el potencial de reposo. En estas condiciones, cuando el receptor GABA<sub>A</sub> es activado, el ión cloro fluye hacia el interior celular produciendo la clásica hiperpolarización postsináptica. (Blaesse y col., 2009).

Los cotransportadores del anión Cl<sup>-</sup> mencionados en el párrafo anterior se localizan en la membrana celular y son conocidos por las siglas CCCs (del inglés *cation-chloride cotrasporters*). Son una familia de glucoproteínas que se clasifican en

tres grupos funcionales según estén asociados a: (i) Un único tipo de cotransportador  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  (NCC); (ii) dos subtipos de cotransportadores  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  (NKCC 1-2); o (iii) cuatro subtipos de cotransportadores  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$  (KCC 1-4). El movimiento de iones a través de los CCC no tiene efecto directo sobre el potencial de membrana celular, ya que la estequiometría de transporte de los CCC es electroneutra. En células del sistema nervioso es especialmente importante la presencia de NKCC1 (favorece la entrada del ión  $\text{Cl}^-$  en la célula) y de KCC2 (favorece la salida de dicho ión) (Blaesse y col., 2009).

Además de ser permeables al anión  $\text{Cl}^-$ , los receptores  $\text{GABA}_A$  dejan fluir el ión bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) que puede afectar al potencial de reversión de las respuestas mediadas por el receptor  $\text{GABA}_A$ . Es de destacar que a altas concentraciones intracelulares de  $\text{Cl}^-$ , la influencia de  $\text{HCO}_3^-$  es mínima, mientras que a bajas concentraciones de  $\text{Cl}^-$  intracelular alteraciones del  $\text{HCO}_3^-$  podrían modificar el potencial de reversión de los receptores  $\text{GABA}_A$  ( $\text{EGABA}_A$ ) (Kaila y Voipio, 1987). Además el ión  $\text{HCO}_3^-$  está implicado en la regulación del pH intracelular (Chesler, 2003; Romero y col., 2004; Hentschke y col., 2006).

### **Los receptores $\text{GABA}_B$ .**

Los receptores  $\text{GABA}_B$  son de tipo metabotrópico, es decir, están acoplados a proteína G (Wojcik y Neff, 1984; Hill, 1985; Karbon y Enna, 1985). Se localizan tanto pre- como postsinápticamente. Su activación genera potenciales sinápticos lentos mediados por un aumento de la conductancia del ión  $\text{K}^+$ . Además los receptores  $\text{GABA}_B$  están asociados a una disminución de la conductancia al ión  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que le confiere consecuencias funcionales distintas en terminales presinápticos y células postsinápticas.



Los receptores GABA<sub>B</sub> se presentan como un heterodímero formado por 2 subunidades designadas como GABA<sub>B1(a-b)</sub> y GABA<sub>B2</sub>. Ambas poseen un alto peso molecular (110 KDa) y están compuestas por siete dominios transmembrana (Jones y col., 1998; Kaupmann y col., 1998; White y col., 1998) . La subunidad GABA<sub>B1</sub> es el sitio de unión del agonista y la subunidad GABA<sub>B2</sub> es el sitio de unión de la proteína G y posee una larga cadena extracelular en su N-terminal que le permite a GABA<sub>B1</sub> alcanzar la superficie celular que está asociada al retículo endoplasmático (revisado en Bowery y col., 2002). Los receptores GABA<sub>B</sub> regulan los niveles de AMPc (AMP cíclico) intracelular ya que activan proteínas G, principalmente : G<sub>i</sub>α y G<sub>o</sub>α que inhiben a las isoformas I, III, V y VI de la Adenilato Ciclasa (revisado en Simonds, 1999).

A nivel presináptico, la activación de receptores GABA<sub>B</sub> bloquea canales de calcio voltaje dependientes (del inglés *voltage-gated calcium channels (VGCCs)*) como los canales de calcio tipo N (Ca<sub>v</sub>2.2) o tipo P/Q (Ca<sub>v</sub>2.1) (Lambert y Wilson, 1996; Chen y van den Pol, 1998; Bussi res y El Manira, 1999). A nivel postsináptico, el receptor GABA<sub>B</sub> está relacionado con la modulación de distintas conductancias de K<sup>+</sup> (Wagner y Dekin, 1997; Lüscher y col., 1997; revisado en: Bowery y col., 2002).

Los antagonistas de los receptores GABA<sub>B</sub> son: Faclofeno, Saclofeno, CGP 55845 y los agonistas: Baclofeno y CGP 27492. (Flórez, 2003). La conductancia a K<sup>+</sup> es bloqueada en presencia de Cs<sup>+</sup> intracelular por lo tanto si se agrega Cs<sup>+</sup> a la solución de la pipeta de registro se bloquean todas las conductancias de K<sup>+</sup>, incluidas las corrientes de pérdida o fuga de K<sup>+</sup>, permitiendo una mejor fijación de corriente durante los registros, pero también se estarán bloqueando los canales asociados a receptores GABA<sub>B</sub> (McLean y col., 1996).

**Interneuronas inhibitoras GABAérgicas del hipocampo.**

La interneuronas GABAérgicas se clasifican por: *(i)* su apariencia morfológica, (ej: células en cesto, horizontales o estrelladas); *(ii)* la distribución de sus proyecciones axónicas y posición del soma en diferentes estratos o capas (ej: células O-LM, localizadas en *oriens* y *lacunosum moleculare*, y P-LM, localizadas en el estrato piramidal lacunosum moleculare); *(iii)* su contenido químico (parvoalbúminas positivas (PV<sup>+</sup>) y colecistoquininas positivas (CCK<sup>+</sup>); *(iv)* su comportamiento fisiológico (ej: hay interneuronas que expresan distintas corrientes de calcio voltaje dependientes o distintos tipos de receptores de glutamato y *(v)* la red de interconexiones entre ellas. Además las interneuronas se pueden nombrar combinando varias de estas clasificaciones (Maccaferri y Lacaille, 2003; Klausberger y Somogyi, 2008).

**La transmisión colinérgica en Hipocampo.**

Las neuronas colinérgicas centrales se localizan principalmente en el núcleo basal (de Meynert) y los núcleos septales. Las células piramidales de CA1 reciben aferencias colinérgicas procedentes de los axones de las neuronas colinérgicas del núcleo medial del *septum* y de la banda diagonal de Broca. (Felten y Shetty, 2009).

El sistema colinérgico juega un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria. La ACh fue la primera molécula identificada como neurotransmisor en el sistema nervioso central, descubierta por **Otto Loewi** en **1921**. Está compuesta por un grupo colina y un grupo acetilo, es sintetizada por la enzima colín acetiltransferasa (ChAT) a partir de colina (captada del torrente sanguíneo) y un grupo acetilo cedido por acetilcoenzima A (producto del metabolismo oxidativo mitocondrial). La ACh se libera en vesículas sinápticas y tras su liberación se une a receptores colinérgicos de la

membrana postsináptica siendo rápidamente hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa (Felten y Shetty, 2009).

Se sabe que interacciones entre el sistema colinérgico y el glutamatérgico pueden modificar la plasticidad sináptica del hipocampo e intervienen en procesos que subyacen al aprendizaje y la memoria (Aigner, 1995; Ovsepian y col., 2004; Fernández de Sevilla y col., 2008; Fernández de Sevilla y Buño, 2010). Por otro lado, lesiones en las proyecciones colinérgicas del circuito septohipocampal producen déficits cognitivos. Las aferencias del *septum* al hipocampo liberan ACh generando el ritmo theta ( $\theta$ ) del hipocampo (Dudar, 1977) que ha sido relacionado con el aprendizaje y la memoria (Huerta y Lisman, 1995; Hoffman y col., 2002). La activación prolongada de los receptores muscarínicos colinérgicos (mAChRs) puede inducir un aumento en la eficacia de las sinapsis glutamatérgicas (Auerbach y Segal, 1996; Fernández de Sevilla y col., 2008; Fernández de Sevilla y Buño, 2010). Todo ello sugiere que la actividad colinérgica puede ser central en la codificación de la memoria y el aprendizaje (Hasselmo, 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, la relación entre el sistema colinérgico y el glutamatérgico ha sido ampliamente estudiada en hipocampo y en otras estructuras, mientras que se conocen solo parcialmente las posibles interacciones entre el sistema colinérgico y el GABAérgico. Por entre el sistema colinérgico y el GABAérgico y los mecanismos que las subyacen.

## **Liberación de Neurotransmisor.**

Para que se realice la liberación del neurotransmisor es necesario que el  $\text{Ca}^{2+}$  entre en el terminal presináptico a través de los VGCCs. Una vez dentro de la terminal el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares que a su vez liberan mas  $\text{Ca}^{2+}$ , de los

reservorios intracelulares (Cabezas y Buño, 2006). Este aumento de calcio en el interior celular permite la formación del complejo SNARE y por tanto la fusión de la membrana de la vesícula donde se almacena el NT con la membrana plasmática y a consecuencia de esto se libera el NT, por exocitosis, a la hendidura sináptica (Augustine, 2001). Una vez liberados, los componentes de la membrana vesicular son recaptados por la célula. Ésta los endocita, los clasifica dentro de los endosomas y los recicla para formar nuevas vesículas sinápticas.

Los NT son liberados por los terminales sinápticos en paquetes cuánticos, es decir, como múltiplos de una unidad mínima llamada *quantum*. Tradicionalmente se ha considerado que un *quantum* de NT corresponde al contenido de una única vesícula sináptica (es decir, comprende los cientos de moléculas de transmisor contenidos en la vesícula). Esta teoría se denomina **Hipótesis Vesicular** y todavía sigue abierto el debate sobre si un único sitio activo, en una sinapsis central, libera una única vesícula o libera más de una simultáneamente, lo que se denomina liberación multivesicular (Auger y col., 1998; Wadiche y Jahr, 2001; Christie y Jahr, 2006; Cabezas y Buño, 2006, 2011; Ricci-Tersenghi y col., 2006).

Atendiendo a su disposición para ser liberadas las vesículas que contienen el NT se pueden dividir en: *(i)* vesículas del RRP (del inglés: *ready releasable pool*) que se encuentran ancladas a la zona activa del terminal presináptico, y están listas para ser exocitadas cuando llegue el estímulo; *(ii)* vesículas de reserva que se reclutan hacia la zona activa cuando se produce una estimulación mantenida y; *(iii)* pool de reposo o distal (Südhof, 2000).

Se ha propuesto un modelo de función sináptica según el cual la probabilidad inicial de liberación dependería del tamaño del RRP (Dobrunz y Stevens, 1997) y se ha

observado una correlación entre esta probabilidad y el tamaño del pool de vesículas (Murthy y col., 1997).

Atendiendo a la disposición del NT para ser liberado por el terminal, se puede hablar de aumento o de una disminución de la eficacia sináptica, es decir de facilitación o de depresión sináptica. Este fenómeno ocurre en un segundo o menos y decae rápidamente. Para observarlos se evocan dos respuestas sinápticas con una separación temporal de milisegundos (por ejemplo 50 ms) y se estudia la relación que existe entre ambas respuestas. Si la segunda respuesta está aumentada con respecto a la primera hablamos de **facilitación por pares de pulsos (PPF)**, del inglés *paired pulse facilitation*) y si la segunda respuesta se ve disminuida con respecto a la primera se trataría de **depresión por pares de pulsos (PPD)**, del inglés *paired pulse depression*).

La PPF es causada por el incremento de la probabilidad de liberación del NT, ligado al incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que se produce tras la llegada de del primer potencial de acción y que puede permanecer durante un tiempo suficiente para coincidir con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por el siguiente potencial de acción (Creager y col., 1980).

### **Consecuencias funcionales de la activación de receptores para endocannabinoides.**

Los receptores para endocannabinoides de tipo 1 ( $\text{CB}_1$ ) presentes en las terminales de las interneuronas  $\text{CCK}^+$  (Katona y col., 1999; Freund, 2003) están implicados en mecanismos que regulan la liberación de GABA como es el fenómeno conocido como DSI (del inglés *Depolarization-induced supresion of inhibition*), **fenómeno por el cual la despolarización de la neurona postsináptica produce la**

**supresión de la inhibición** (Llano y col., 1991; Pitler y Alger, 1992; Alger y col., 1996; (Wilson and Nicoll, 2002).

Cuando la neurona postsináptica (en este caso la neurona piramidal de CA1) es despolarizada se activan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  VGCCs lo que aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e induce la liberación de 2-Acilglicerol (2AG).

El 2AG es liberado por la neurona postsináptica y se propagan retrógradamente uniéndose a su receptor  $\text{CB}_1$  situado en el terminal presináptico de las interneuronas  $\text{CCK}^+$ . La unión del eCB con su receptor antagoniza los VGCC tipo N, **produciéndose una disminución de la probabilidad de liberación de GABA o DSI** (del inglés *Depolarization-induced suppression of inhibition*) (Chevalleyre y Castillo, 2004; Chevalleyre y col., 2006).

En realidad el sistema es más complejo, ya que los astrocitos poseen también receptores  $\text{CB}_1$  que participan en la modulación de las respuestas sinápticas. (Navarrete y Araque, 2008; 2010).

## **La i-LTD.**

La i-LTD es inducida por la liberación de eCBs que activan receptores  $\text{CB}_1$ . Inicialmente la i-LTD es bloqueada por el agonista inverso de los receptores  $\text{CB}_1\text{R}$ , AM251, aunque a intervalos de tiempo más largos AM251 es ineficaz expresándose la i-LTD por una modificación de la maquinaria encargada de la liberación del neurotransmisor (Wilson y Nicoll, 2002; Chevalleyre y col., 2006; Lovinger, 2008; Kano y col., 2009; Castillo y col., 2011).

La activación de receptores mGluR-I activa fosfolipasa C (PLC) una proteína integral de membrana que partiendo del fosfoinositoldifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) lo hidroliza y

genera Diacilglicerol (DAG) e  $IP_3$ . El  $IP_3$  se une a sus receptores, localizados en el retículo endoplasmático y produce así un aumento de la concentración citoplasmática de  $Ca^{2+}$  que es liberado de los reservorios de  $IP_3$ . Al mismo tiempo el DAG es hidrolizado por la Diacilglicerol lipasa (DGL) y se genera: 2AG, el eCBs que media en este fenómeno.

## **Receptores de membrana en interneuronas de Hipocampo.**

Las **interneuronas  $CCK^+$**  poseen en sus terminales axónicos VGCC tipo N que son bloqueados específicamente por  $\omega$ -conotoxina GVIA (Hefft y Jonas, 2005; Karson y col., 2009). También poseen receptores para endocannabinoides (eCBs) tipo 1 ( $CB_1$ ) en sus terminales axónicos.

Además las interneuronas  $CCK^+$  expresan receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs) tipo M1 y M3 y receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (Fukudome y col., 2004; Karson y col., 2009; Martin y Alger, 1999), estando los mAChRs y los receptores metabotrópicos de glutamato acoplados a fosfolipasa C y proteína  $G_{q/11}$ .

Las **interneuronas  $PV^+$** , presentan por el contrario, VGCC tipo P/Q antagonizados específicamente por  $\omega$ -agatoxina VIA (Hefft y Jonas, 2005; Karson y col., 2009). Poseen receptores muscarínicos tipo M2 que están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa a través de proteína  $G_{i/o}$  (Hájos y col., 1998; Fukudome y col., 2004; Karson y col., 2009) y receptores  $\mu$ -Opiodes.

Dado que las interneuronas  $CCK^+$  expresan mAChRs (tipo M1 y M3) y receptores  $CB_1$  para eCBs es importante investigar los efectos de la activación conjunta de ambos receptores sobre la eficacia de las sinapsis GABAérgicas en hipocampo de rata. Es conocido que la activación de mAChRs genera una reducción sostenida de la

probabilidad de liberación de GABA de las terminales de las interneuronas CCK<sup>+</sup> conocida como i-LTD (Chevalleyre y Castillo, 2004).

Dado que las interneuronas CCK<sup>+</sup> del hipocampo expresan; *(i)* receptores nicotínicos (nAChRs) inotrópicos, de los que hay al menos diecisiete tipos clasificados en cinco subclases:  $\alpha 1-10$ ,  $\beta 1-4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (Wu y Lukas, 2011), predominando en hipocampo los que poseen subunidad  $\alpha 7$  (Alkondon y Albuquerque, 1993); *(ii)* receptores muscarínicos (mAChRs) (tipo M1 y M3) y *(iii)* receptores CB<sub>1</sub> para eCBs es importante investigar los efectos de la activación conjunta de estos receptores sobre la eficacia de las sinapsis GABAérgicas en el hipocampo, de los que se conocen algunos efectos, como la i-LTD.

La funcionalidad de las interneuronas inhibitorias del hipocampo pueden ser modulada por receptores Kainato (Rodríguez-Moreno y col., 1997; Rodríguez-Moreno y col., 2000).

## **El Ritmo Theta en Hipocampo.**

El ritmo Theta en el hipocampo presenta una frecuencia de entre 3 y 12 Hz. Su generación depende de la descarga rítmica de una población de neuronas localizadas en el núcleo medial del *septum* y en la banda diagonal de Brocca (Petsche y col., 1962; Gaztelu y Buño, 1982). La estimulación de estas áreas genera ritmo  $\theta$  en el hipocampo y lesiones en estos núcleos o en el fórnix dorsal (por donde transcurren las aferencias al hipocampo) abolen el ritmo  $\theta$  y la ritmicidad de las descargas en el hipocampo. (Green y Arduini I, 1954; Petsche y Stumpf, 1960; Buño y col., 1978). El estudio del ritmo theta en Hipocampo es importante puesto que se correlaciona con actividades como la realización del movimiento voluntario, atención, aprendizaje y la fase del sueño llamada REM asociada al movimiento rápido de ojos.



Es importante destacar que tanto las neuronas CCK<sup>+</sup> como las PV<sup>+</sup>, intervienen activamente en la generación del ritmo theta del hipocampo las primeras modulando su aparición y las segundas regulando su frecuencia.

### **Importancia funcional de la plasticidad sináptica de la inhibición.**

Las modificaciones a largo plazo de la inhibición sináptica son esenciales para garantizar el equilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal, un requisito fundamental en la función sensitiva, cognitiva y motora de los seres vivos. La inhibición regula la excitabilidad neuronal, la actividad de la red neuronal y la plasticidad de sinapsis excitadoras, pero los mecanismos que subyacen a los cambios a largo plazo de la inhibición permanecen parcialmente conocidos.

Dado que los mecanismos que subyacen a la **Plasticidad Sináptica** de la inhibición son poco conocidos **en este trabajo experimental de la tesis** se analiza la regulación de la efectividad sináptica inhibitoria mediada por la interacción entre la actividad colinérgica y la de endocannabinoides **sobre neuronas piramidales de CA1 de Hipocampo.**

Para ello se investigaron *in vitro*, en células piramidales de la subregión CA1 del hipocampo de rata los efectos sobre la inhibición monosináptica GABAérgica de un pulso breve de ACh sobre la dendrita apical combinado con pulsos despolarizantes o ráfagas de estimulación intracelular de la célula piramidal con una secuencia que simuló la actividad intracelular durante el ritmo theta del hipocampo.

## **II. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Las sinapsis glutamatérgicas formadas por las SC y las neuronas piramidales de CA1 han sido ampliamente estudiadas como modelo clásico de plasticidad sináptica. Por el contrario se le ha prestado menos atención el estudio de la plasticidad GABAérgica. Por ello el siguiente trabajo pretende **investigar en neuronas piramidales de CA1 del hipocampo el efecto a largo plazo de la activación combinada de receptores colinérgicos, del sistema endocannabinoide y la contribución de la actividad de la neurona postsináptica, sobre la efectividad sináptica de la transmisión GABAérgica mediada por receptores GABA<sub>A</sub>.**

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1. Estudiar el efecto de la activación de receptores colinérgicos y de la despolarización postsináptica sobre la plasticidad y la efectividad sináptica de la transmisión GABAérgica monosináptica.**
- 2. Analizar el tipo de transmisión sináptica inhibitoria que se activa en nuestras condiciones experimentales y las posibles modificaciones de las propiedades biofísicas de la transmisión GABAérgica inducidas por despolarización y activación de receptores colinérgicos.**
- 3. Investigar la contribución de la actividad presináptica sobre la plasticidad y la efectividad sináptica de la transmisión GABAérgica monosináptica.**
- 4. Analizar el efecto de la activación de receptores para endocannabinoide sobre la plasticidad y la efectividad sináptica de la transmisión GABAérgica monosináptica.**

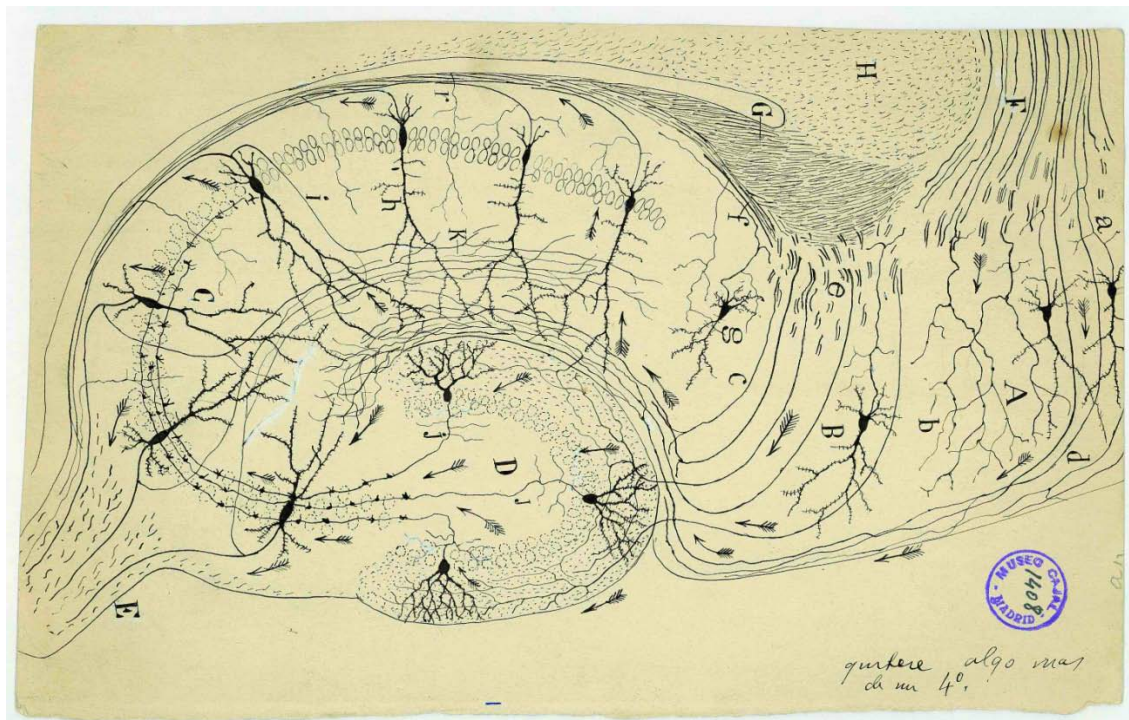
- 5. Estudiar la señalización intracelular y los mecanismos moleculares que median los efectos de combinados de endocannabinoides, colinérgicos y de la actividad postsináptica.**
- 6. Investigar si este tipo de plasticidad sináptica es fisiológica y sus consecuencias funcionales.**

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Hipocampo como modelo experimental.

El hipocampo es un modelo experimental ampliamente utilizado para la investigación en neurofisiología en general y especialmente en el estudio de la LTP. La formación del hipocampo juega un importante papel en el aprendizaje y la memoria (Bliss y Collingridge, 1993; Frey y Morris, 1998) y fue la primera estructura donde se describe experimentalmente la LTP (Bliss y Lomo, 1973). El soma de las neuronas piramidales de CA1 se localiza en la capa celular de neuronas piramidales. Estas neuronas extienden sus dendritas apicales hacia el *stratum radiatum* (SR) y las dendritas basales hacia el *stratum oriens* (SO). El hipocampo se organiza como un circuito excitatorio trisináptico (Teyler y DiScenna, 1984) constituido por: (i) la vía perforante, la cual conecta la corteza entorrinal con el giro dentado; (ii) las fibras musgosas, que conectan la células granulares del giro dentado con la región de CA3; y (iii) las Colaterales de Schaffer (SC), que conectan las neuronas piramidales del área de CA3 con las células piramidales del área de CA1 (**Figura 1**).

Mediante la obtención de rebanadas de cerebro, los estudios *in vitro* han ampliado las posibilidades de investigar las propiedades electrofisiológicas en circuitos sinápticos con organizaciones celulares muy precisas. Es el caso de las rebanadas transversales del hipocampo, donde la organización laminar de sus componentes neuronales permite que gran parte de la circuitería sináptica permanezca intacta, facilitando el registro intracelular y la estimulación selectiva de sus vías aferentes, así como la aplicación de diferentes reactivos y fármacos. El estudio de la plasticidad sináptica en el hipocampo ha permitido establecer una serie de paradigmas experimentales de procesos cognitivos superiores, tales como la LTP y la LTD, centrándose en las modificaciones pre- y postsinápticas.

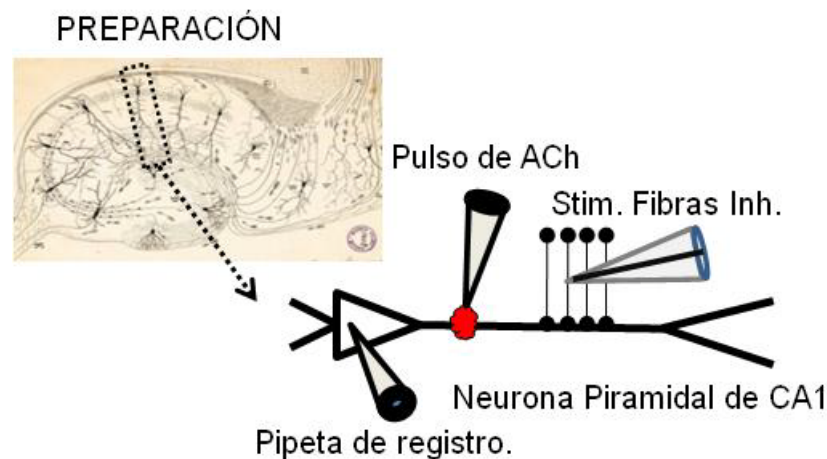


**Figura 1: Dibujo de un corte de hipocampo de mamífero obra de Cajal (1904).** Se señalan las vías que proceden de corteza entorrinal (**d**) y proyectan a las neuronas granulares del Giro Dentado (**D**). Estas neuronas envían sus axones hacia las neuronas piramidales de CA3 (**C**) que, por medio de las Colaterales de Schaffer (**K**), contactan con las neuronas piramidales de CA1 (**h**), completando el circuito trisináptico. CA1 proyecta hacia la corteza entorrinal, el subículo (**g**) que proyecta hacia corteza entorrinal y el Fórnix Postcomisural (**E**) Las neuronas piramidales de CA1 y CA3 envían sus axones al fórnix precomisural (las flechas en **h** y **C**).

## 2. Obtención y preparación de las rodajas de hipocampo.

Las rodajas de hipocampo se obtiene de ratas Wistar de 12-20 días de edad, de ambos sexos (Borde y col., 1995). Los animales son decapitados, cráneotomizados y se les extrae rápidamente el encéfalo que es sumergido en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a  $\sim 4^{\circ}\text{C}$ . Inmediatamente después de la extracción del tejido ( $<1$  minuto), se coloca el encéfalo en la cámara de corte y se obtienen cortes transversales (300-400  $\mu\text{m}$  de espesor) con un vibrátomo (Vibratome 3000 PELCO 100 Vibratome Sectioning System).

Las rodajas así obtenidas, se incuban durante > 60 minutos en LCA, burbujeadas permanentemente con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>), a temperatura ambiente (21-24°C). El LCA contiene (en mM): NaCl 124; KCl 2,69; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25; MgSO<sub>4</sub> 2; NaHCO<sub>3</sub> 26; CaCl<sub>2</sub> 2; glucosa 10 y ácido ascórbico 0,40 (pH= 7.35).



**Figura 2:** Esquema del preparado experimental que incluye la figura de Cajal mostrando la neurona piramidal de CA1 (**recuadro**) y el esquema de dicha neurona piramidal, la pipeta de registro, la pipeta de aplicación del pulso de ACh y la pipeta septada de estimulación de las fibras inhibitorias.

### 3. Técnica de registro.

#### 3.1. Identificación de las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo.

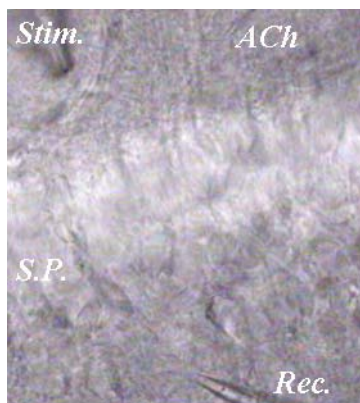
Una vez incubadas, las rodajas son transferidas a una cámara de registro (para rodajas sumergidas) con un volumen de 1.5 mL, montada sobre un microscopio “upright” (Olympus; BX51WI, Tokio, Japón), equipado con un sistema de video con microscopía *Nomarski* o microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) (“*differential interference contrast*”) adaptado tanto al espectro de luz visible como al infrarrojo.

El microscopio posee dos objetivos uno 10X y otro 40X de inmersión en agua (especialmente diseñado para la iluminación de infrarrojo cercano, 775 y 990 nm).



La imagen se visualiza en un monitor en blanco y negro SONY SSM-121CE (Tokio, Japón) y en la pantalla del ordenador usado para realizar todo el abordaje experimental (*Pentium IV*).

Ambos aparatos, tanto el monitor, como el ordenador, reciben la imágenes de una cámara COHU 4922 5010/000 acoplada al microscopio.



**Figura 3** Microfotografía DIC de un experimento tipo: Se indica el stratum pyramidale (**S.P.**), la pipeta de estimulación inhibitoria (**Stim.**), la pipeta de registro (**Rec.**) y la de aplicación del pulso de ACh.

El sistema se apoya sobre una mesa antivibratoria (TMC, Peabody, MA, EEUU), con dispositivo neumático de amortiguación, que posibilita la obtención de registros estables a largo plazo impidiendo la transmisión de vibraciones ambientales a la preparación. Todo el sistema se encuentra dentro de una jaula de Faraday, que lo aísla eléctricamente evitando así la introducción de artefactos eléctricos externos en los registros obtenidos. Las rebanadas son incubadas con LCA (1mL/minuto a temperatura ambiente), de forma que el recambio de LCA se completa en ~5 minutos. Durante las diferentes condiciones experimentales se le añaden al LCA diferentes tipos de fármacos según el requerimiento de cada experimento.

Los experimentos se realizan en su mayoría a temperatura ambiente, aunque también se llevan a cabo registros a 32-34° C que son idénticos a los obtenidos a temperatura ambiente, por lo que se continúa trabajando bajo condiciones ambiente.

### **3.2. Registros electrofisiológicos.**

Los registros se llevan a cabo usando la técnica de parche de membrana (en inglés *patch-clamp*) en la configuración de célula entera en la modalidad de fijación de voltaje (en inglés, *voltage-clamp* (VC)) con objeto de medir y caracterizar las corrientes iónicas de membrana citoplasmática y en la modalidad de fijación de corriente (en inglés, *current-clamp* (CC)) con objeto de caracterizar los cambios de voltaje en función de cambios en la conductancia de la célula, lo que resulta más fisiológico.

En la modalidad de fijación de voltaje, los cambios en la resistencia de membrana no afectan al registro de las corrientes iónicas que se suman linealmente, mientras en condiciones de fijación de corriente, los cambios en el potencial de membrana van asociados a cambios no lineales en la resistencia de la membrana, lo que puede complicar la interpretación de los resultados.

Los registros, tanto en fijación de voltaje como de corriente, son obtenidos con un amplificador Dagan (Dagan Corporation, Minneapolis, MN, EEUU). Se emplea un solo electrodo de registro ("*continuous single electrode voltage-clamp*" y "*continuous single electrode current-clamp*"). En la modalidad de fijación de voltaje, las capacitancias rápida y lenta son neutralizadas y la resistencia en serie compensada (alrededor del 80%). El potencial de membrana se controla gracias a protocolos (descritos más adelante) que se generan con el programa de ordenador pCLAMP 9.2 (Axon Instruments, perteneciente a Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EEUU)) con el que también se controlaron los estímulos y se adquirieron y almacenaron los datos.

Todo lo anterior fue registrado en un ordenador *Pentium IV* a través de una tarjeta de conversión analógico-digital DigiData 1322A (Axon Instruments).

Los electrodos de registro se fabrican a partir de capilares de borosilicato con fibra interna (OD-ID: 1.5-0.86 mm; Sutter Instrument Co., Novato, CA, EEUU), y una resistencia de 3-8 M $\Omega$ . Los capilares se rellenan con diferentes tipos de solución intracelular que contienen:

### 3.2.1. Soluciones intracelulares.

**3.2.1.1. Solución intracelular con 10 mM Cl<sup>-</sup>:** que contiene: 140 mM de KMeSO<sub>4</sub>, 10 mM de HEPES ácido, 4 mM de Na<sub>2</sub>-ATP, 0,3 mM de Na-GTP, 10 mM de KCl (pH=7,3).

En estas condiciones, si aplicamos la ecuación de Nerst para calcular el potencial de equilibrio del ión Cl<sup>-</sup>:

$$E_{Cl^-} = -RT/zF \ln [Cl^-]_{Ext} / [Cl^-]_{Int}$$

Donde “R” es la constante universal de los gases, “T” es la temperatura en grados Kelvin, “z” es la valencia del ión, “F” es la constante de Faraday y [Cl<sup>-</sup>]<sub>Ext</sub> y [Cl<sup>-</sup>]<sub>Int</sub> son la concentración externa e interna del ión Cl<sup>-</sup>. Con la concentración extracelular de Cl<sup>-</sup> empleada de 128,69 mM y la concentración de Cl<sup>-</sup> intracelular de 10 mM y a temperatura ambiente (20-22 °C), el  $E_{Cl^-}$  calculado según la ecuación de Nerst es: -64,75 mV.

Esta solución intracelular se usa con los protocolos de fijación de voltaje tanto en el de TBS como en el de despolarizaciones sucesivas (*Ver apartado: 3.2.3.1*).

**3.2.1.2. Solución intracelular con 110 mM de  $\text{Cl}^-$ :** 110 mM de CsCl, 30 mM de gluconato-K, 10 mM de HEPES-K, 4 mM de Mg-ATP, 0,3 mM de Na-GTP (pH=7,3).

Con la concentración extracelular de  $\text{Cl}^-$  empleada de 128,69 mM y la intracelular de 110 mM  $\text{Cl}^-$ , a temperatura ambiente (20-22 °C),  $E_{\text{Cl}^-}$  calculado según la ecuación de Nerst es: -3,92 mV.

Esta solución intracelular se usa en el protocolo de fijación de voltaje de despolarizaciones sucesivas (*Ver apartado: 3.2.3.1*).

**3.2.1.3. Solución intracelular con 1 mM de  $\text{Cl}^-$ :** 140 mM de gluconato-K, 10 mM de HEPES-K, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 4 mM de  $\text{Na}_2\text{-ATP}$ .

Con la concentración extracelular de  $\text{Cl}^-$  empleada de 128,69 mM y la intracelular de 1mM  $\text{Cl}^-$ , a temperatura ambiente (20-22 °C),  $E_{\text{Cl}^-}$  calculado según la ecuación de Nerst es: -123,20 mV.

Esta solución intracelular se usa con los protocolos de fijación de corriente.

### 3.2.2. Estimulación eléctrica.

La estimulación eléctrica de los axones de las neuronas inhibitorias se realiza en el SR por medio de: (i) un único electrodo de alambre bipolar de níquel-cromo (80  $\mu\text{m}$  de diámetro) o; (ii) a través de capilares de vidrio septado rellenos con el liquido extracelular, en los que se introdujeron dos alambres de plata clorurados (Ag/AgCl).

Tanto el alambre de nicromo como los alambres de plata clorurados estaban conectados a un estimulador (Grass S88, Quincy, MA, EEUU) a través de una unidad de aislamiento (SIU 5, GRASS). Se escoge la polaridad de los electrodos adecuada, a fin de obtener una respuesta sináptica óptima y se ajusta la intensidad de estimulación

para evocar IPSCs con valores medios de entre 100 y 200 pA e IPSPs de 2 a 8 mV. La estimulación se realiza con pares de pulsos de 300  $\mu$ s a una latencia de 50 ms, a fin de estudiar la facilitación o depresión por pares de pulsos (en inglés, PPF y PPD) para determinar si el fenómeno era pre- o postsináptico (*Ver figuras 2 y 3*).

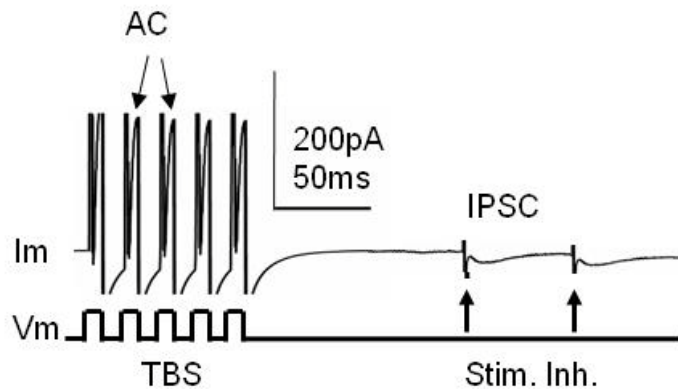
### 3.2.3. Protocolos.

#### 3.2.3.1. Protocolo emulando el ritmo theta en condiciones de fijación de voltaje.

La TBS simula la actividad de los APs (del inglés *action potentials*) generados en el hipocampo de los roedores durante el ritmo  $\theta$  (Núñez y col, 1987). Como en este caso nos encontramos en fijación de voltaje, en vez de hablar de APs, hablamos de ACs (del inglés *action currents*).

El protocolo TBS aplicado en este caso consiste en 4-5 ACs generadas a una frecuencia 3-5 Hz e inducidas por pulsos despolarizantes breves de 15 ms de duración cada uno de los cuales generaba una AC. Estas 4-5 ACs eran seguidas por un par de pulsos que evocaban dos IPSCs a una latencia de 50 ms (*Figura 4*).

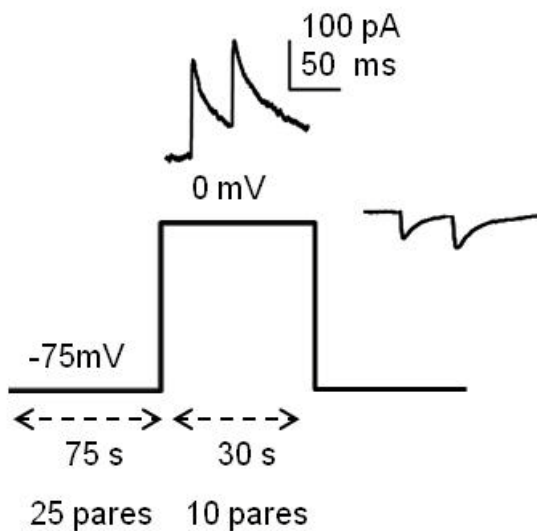
Este protocolo se aplica durante todo el experimento adquiriéndose controles (IPSCs controles) durante los primeros 10-15 minutos, tras los cuales se aplica un pulso de ACh por microiontoforesis (*ver apartado 3.2.4*), continuándose el registro durante una hora después de la aplicación de la ACh.



**Figura 4: Protocolo TBS**  
usado en fijación de voltaje. El registro superior (*Im*) muestra las ACs y el par de IPSCs generados. Abajo, (*Vm*) se muestra el control de voltaje que genera las despolarizaciones que producen las ACs y mediante flechas se muestra la estimulación que genera los IPSCs.

### 3.2.3.2. Protocolo de despolarizaciones sucesivas en condiciones de fijación de voltaje.

Consiste en despolarizaciones que duran 30 segundos y que se repiten cada 75 segundos y se aplican durante todo el experimento, adquiriéndose controles de los pares de IPSCs tanto a 0 mV como a -75 mV (**Figura 5**).



**Figura 5: Protocolo de despolarizaciones sucesivas en fijación de voltaje.** La parte inferior muestra el control de voltaje de 75s a -75 mV y 30s a 0 mV. La estimulación inhibitoria se indica esquemáticamente debajo (flechas dobles). Este protocolo se repite durante todo el tiempo que dura el experimento. También se muestran ejemplos de IPSCs obtenidos durante la despolarización y la hiperpolarización.

La estimulación inhibitoria se realiza a una frecuencia de un par de estímulos cada 3 segundos. Por tanto, durante los 75 s que la célula permanece hiperpolarizada hay 25 pares de IPSCs y 10 pares durante el tiempo que permanece despolarizada a 0

mV. El par de pulsos se aplica con una latencia de 50 ms y cada estímulo tiene una duración de 300  $\mu$ s.

También se utiliza una modificación de este protocolo en el que las despolarizaciones duraban 10 segundos.

### 3.2.3.3. Protocolo TBS en fijación de corriente.

El protocolo TBS consiste en ráfagas a una frecuencia de 3-5 Hz, de 100 ms de duración, y compuestas de 4 ó 5 pulsos despolarizantes breves que generan un AP cada pulso. Estos PAs van seguidos de un par de IPSPs evocados separados 50 ms (**Figura 8**).



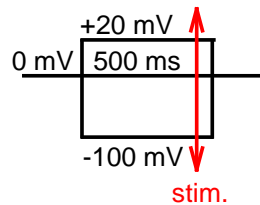
**Figura 6: Protocolo TBS en fijación de corriente.** Se generan 4 APs seguidos por un par de estímulos en el SR que generan IPSPs. Se toman controles durante 10-15 minutos. Se aplica ACh y se sigue estimulando durante el tiempo que dura el experimento.

### 3.2.3.4. Protocolos para determinar el potencial de reversión del $\text{Cl}^-$ y la dependencia de voltaje de los IPSCs.

Para analizar las posibles modificaciones en el  $E_{\text{Cl}^-}$  se utilizan el siguiente protocolo:

Partiendo de un potencial de membrana de 0 mV, se aplica cada 5s un pulso de 500 ms que lleva el potencial de la célula desde -100 mV a +20 mV en saltos de +10

mV. A cada potencial de membrana se genera IPSCs (**Figura 7**). Con estos experimentos se construyen graficas de la amplitud de los IPSPs en relación al voltaje de membrana o relaciones corriente/voltaje (relación I/V).



**Figura 7:** Protocolo para obtener IPSC en función del voltaje, partiendo de un potencial de 0mV.

### 3.2.4. Aplicación de ACh por microiontoforesis.

La microiontoforesis de ACh se realiza con una pipeta de punta fina ( $\approx 20 \text{ M}\Omega$ ) rellena de ACh disuelta en agua destilada (1 M, pH=4), cuya punta se localiza sobre la dendrita apical  $\approx 70 \text{ }\mu\text{m}$  del soma de la neurona piramidal registrada. La microiontoforesis se realiza por aplicación breve de pulsos de corriente de 100-300 ms generados por un generador de microiontoforesis ION-100T (Dagan Co., Minneapolis, MN, EEUU).

La pipeta se mantiene fuera del baño durante el tiempo en el que se registran los controles, luego se introduce en el tejido y se coloca  $\approx 70 \text{ }\mu\text{m}$  del soma de la célula registrada (**Figura 8**). Una vez realizada la aplicación del pulso de ACh, se retira la pipeta del baño para evitar que se siguiera suministrando la ACh al tejido.

### 3.2.5. Aplicación de GABA mediante pulso de presión.

El GABA se aplica a una distancia de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  del soma de la célula registrada mediante una pipeta de punta fina rellena con GABA diluido en Ringer (0.5 mM). La alta resistencia de la pipeta permite una mayor localización del GABA y evita saturar el sistema. Los pulsos de presión tienen una duración de 30 ms.



Con pulsos de GABA se utiliza el protocolo de despolarizaciones sucesivas de 30 s en condiciones de fijación de voltaje durante los que se aplica GABA a una frecuencia de 1 pulso cada 5 s durante todo el experimento. Se registran controles durante los 10-15 min iniciales y luego se aplica ACh, registrándose las corrientes de GABA durante 1 hora más.



*Figura 8: Esquema de neurona piramidal y de la aplicación de GABA y ACh.*

## 4. Análisis farmacológico.

### 4.1 Reactivos suministrados en el baño.

Los siguientes reactivos se suministran por perfusión en el baño añadidos al LCA:

(N - (Piperidin-1-il) -5 (4-iodofenil) - 1 (2, 4 - diclorofenil)- 4 - metil-1H - pirazol - 3-carboxamida (**AM-251**), agonista inverso de los CB<sub>1</sub>Rs (2 μM).

D (-)-ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (**D-AP5**), antagonista competitivo de los NMDARs (50 μM).

**Atropina**, antagonista competitivo de los receptores colinérgicos muscarínicos (0,3 μM).

**CGP 55845**, antagonista selectivo de los GABA<sub>B</sub>Rs (5 μM).

6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (**CNQX**), antagonista competitivo de los receptores AMPA/Kainato (20 μM).

**GVIA  $\omega$ -conotoxina**, bloquea selectivamente los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes tipo N (0.5  $\mu\text{M}$ ).

Citrato de Metilicaconitina (**MLA**), Antagonista selectivo de la subunidad  $\alpha 7$  de los receptores nicotínicos colinérgicos (125  $\mu\text{M}$ ).

**Nimodipina**, antagonista selectivo de canales de Calcio tipo L (10  $\mu\text{M}$ ).

Picrotoxina (**PiTX**), Inhibidor alostérico de los  $\text{GABA}_A\text{Rs}$  (50  $\mu\text{M}$ ).

**Pirenzepina**, antagonista selectivo de los receptores colinérgicos muscarínicos tipo 1 (75nM).

Tetrahydrocloruro Hidrato de **Metoctramina**, antagonista de los receptores colinérgicos muscarínicos tipo 2 (1  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.2 Reactivos aplicados intracelularmente.

A nivel intracelular (dentro de la pipeta de registro, añadidas a la solución intracelular), se aplican por difusión y diálisis:

**AIP**, péptido inhibidor de CamKII (fragmento 281-309; no permeable), (10  $\mu\text{M}$ ).

1,2-bis (2-aminofenoxi)etano-N,N,N,N- ácido tetra-acético (**BAPTA**), quela rápido el calcio intracelular (20 mM)

Cadena ligera de la toxina botulínica tipo B (**BOTOX**), previene la formación del complejo SNARE y con ello la fusión del complejo endosomal a la membrana plasmática (0.5  $\mu\text{M}$ ). La cadena ligera es impermeable y por no difunde al medio desde la célula de registro

**Chelerritrina**, inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) (1  $\mu\text{M}$ ).

**Fragmento Inhibidor de la Proteína quinasa A (PKA)** (aminoácidos 6-22), inhibe específicamente la PKA (10  $\mu$ M).

**GDP $\beta$ S**, inhibidor de proteína G (2 mM).

**Heparina**, inhibidor de los receptores de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>Rs) (5mg/ mL).

#### **4.3 Casas comerciales suministradoras de los reactivos empleados.**

AM-251, AP5, CGP 55845 y CNQX son suministrados por Tocris Cookson (Bristol, UK).

AIP, ACh, BAPTA, Chelerritrina, fragmento inhibidor de PKA, GDP $\beta$ S, GVIA  $\omega$ -conotoxina, heparina, MLA, metoctramina, nimodipina, picrotoxina y pirenzepina compradas a Sigma-Aldrich (Madrid, España).

TTX se adquiere en Alomone Labs (Jerusalén, Israel).

BOTOX es suministrada por List Biological Laboratories INC (Campbell, CA, EEUU).

### **5. Procesamiento de los resultados.**

#### **5.1 Análisis de los resultados.**

Para el análisis de los registros se usa el Clampfit 10.2 (perteneciente al conjunto de programas denominados pCLAMP; Axon Instruments, Inc.). Para la representación gráfica de los resultados se empleó el programa SigmaPlot (versión 11.0 para Windows; SPSS Inc.) y PowerPoint (Versión 2007 de Microsoft Office).

Los parámetros analizados son:

### 5.1.1. Amplitud del pico de la señal.

A. En condiciones de fijación de voltaje: Se mide la amplitud del pico del IPSC usando: (i) el protocolo de despolarizaciones sucesivas en condiciones de fijación de voltaje (*Ver apartado 3.2.3.2.*). En estas condiciones, a 0 mV se obtienen 10 respuestas por archivo y a -75 mV se registraron 25 respuestas por archivo, y (ii) el protocolo emulando el ritmo theta en condiciones de fijación de voltaje (*Ver apartado: 3.2.3.1*) en el que se hacen promedios de 20 respuestas sucesivas por archivo.

El análisis se lleva a cabo tanto promediando las respuestas de cada archivo como promediando todas las primeras respuestas de todas las células, todas las segundas y así sucesivamente

B. En condiciones de fijación de corriente: Para el protocolo en el que se genera una onda sinusoidal se promedian las respuestas que están cada 20 trazos. Para el protocolo de TBS se procede de la misma manera.

En los protocolos generados por inyección de corriente o voltaje en la condición de fijación de corriente o voltaje se toman todos los archivos generados en cada hiper- y despolarización.

### 5.1.2. Medida de la Tau del IPSC.

La  $T$  (constante de tiempo) se calcula ajustando la pendiente de caída del IPSC a una única función exponencial. Esto se realiza con el programa Clampfit 10.2 y SigmaPlot 11.

### 5.1.3. Cambios en la respuesta por pares de pulsos (PPR).

Se calcula según la fórmula:  $(R2-R1)/R1$ , donde  $R1$  y  $R2$  son las amplitudes del primer y el segundo IPSC, respectivamente, de las respuestas a la estimulación por pares de pulsos (*ver apartado 3.2.2.*).

## **5.2 Análisis estadístico.**

El análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se realizaron con los programas Excel (Microsoft Office 2007) y SigmaPlot 11.0.

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media, indicándose en cada caso el tamaño de la muestra (n). Las diferencias estadísticas fueron establecidas usando el test *t* de *Student*, asignándose un asterisco (\*) a diferencias significativas con  $p < 0,05$ , dos asteriscos (\*\*) a diferencias muy significativas con  $p < 0,01$  y tres asteriscos (\*\*\*) a diferencias altamente significativas con  $p < 0,001$ .

## **IV. RESULTADOS**

En este trabajo se investigan los efectos inducidos por la acción combinada de la ACh y de la actividad generada por la despolarización de las células piramidales de la región CA1 de hipocampo sobre la transmisión sináptica inhibitoria aislada farmacológicamente. El análisis se realiza en condiciones de fijación de corriente y voltaje.

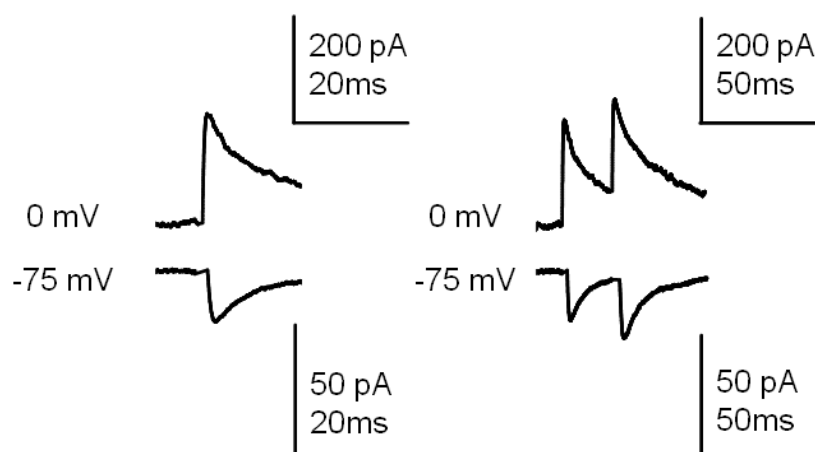
## 1. PLASTICIDAD DE LA SINAPSI INHIBITORIA.

### 1.1. Caracterización de los IPSCs registrados.

Inicialmente se utiliza una solución intracelular con una concentración 10 mM de  $\text{Cl}^-$  lo que con la solución extracelular utilizada resulta en un  $E_{\text{Cl}^-}$  de -64,75 mV (*Ver materiales y métodos; apartado 3.2.1.1*), cercano a los valores observados en neuronas piramidales (Thompson y col., 1988) y células inhibitoras del sistema nervioso central de rata (Farrant y Kaila, 2007).

Con esta solución intracelular (10 mM de  $\text{Cl}^-$ ) en **situación control** y para un **potencial de membrana -75 mV**, las corrientes inhibitorias postsinápticas (los IPSCs) son de entrada y tienen una amplitud promedio de  $-16,24 \pm 3,25$  pA ( $N=16$ ) (*Figura 9*). La escasa amplitud del IPSC se debe a que la fuerza electromotriz, en estas condiciones es escasa, ya que el potencial de membrana se encuentra cerca del potencial de equilibrio del ión  $\text{Cl}^-$  (*Ver materiales y métodos; apartado: 3.2.1.1*).

Sucede al contrario, para un **potencial de membrana de 0 mV**, los IPSCs son en este caso corrientes de salida de considerable amplitud  $294,12 \pm 39,72$  pA ( $N=16$ ) (*Figura 9*). La gran amplitud de los IPSCs se debe a que el potencial de membrana se encuentra lejos del potencial de equilibrio del ión  $\text{Cl}^-$ .



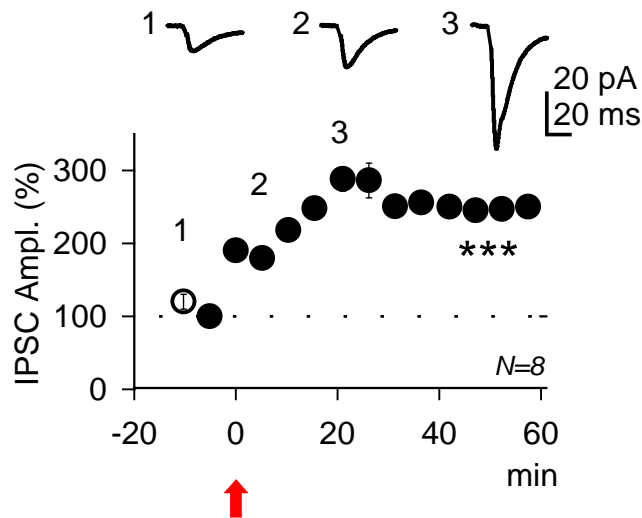
**Figura 9:** Ejemplo de IPSCs registrados a 0 mV y a -75 mV obtenidos de dos células piramidales con un único estímulo (*derecha*) y con un par de estímulos separados 50 ms (*izquierda*).

## 1.2. Estudio de los efectos combinados del protocolo TBS y la aplicación de ACh.

Analizamos los efectos de la aplicación de ACh sobre los IPSCs registrados en condiciones de VC durante el protocolo TBS, que emula el ritmo  $\theta$  de hipocampo (*Ver materiales y métodos apartado 3.2.3.3*), se usa la solución intracelular de 10 mM de  $\text{Cl}^-$  (*Ver materiales y métodos apartado 3.2.1.1*) y se registran los IPSCs a -75 mV. Durante los primeros 10-15 min de registro se toman los controles y posteriormente se aplica un pulso de ACh por microiontoforesis en la base de la dendrita apical de la neurona piramidal registrada.

Después de la aplicación de ACh se produce un aumento gradual de la amplitud de pico del IPSC que se estabiliza a los 20-30 min, llegando a valores del  $241,93 \pm 18,06$  % respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $N=8$ ) y manteniéndose la amplitud de pico del IPSC en valores cercanos a éste hasta el final del experimento ( $\approx 1\text{h}$ ) (*Figura 10*).

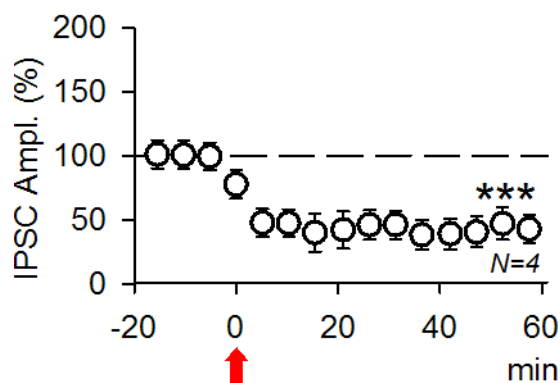




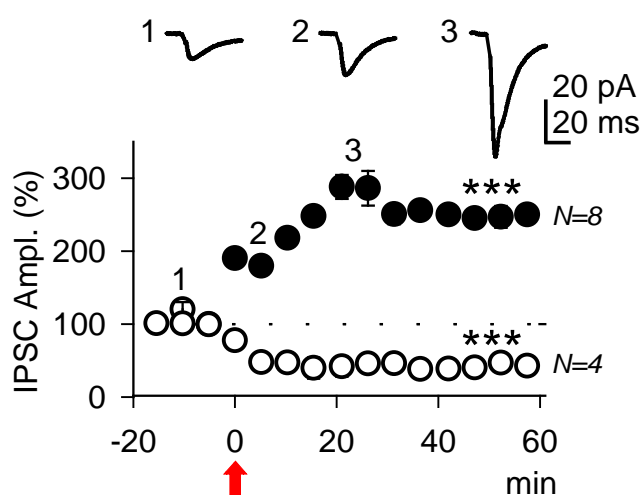
**Figura 10:** Gráfica de la amplitud de pico (% del control) de los IPSCs en función del tiempo durante la aplicación del protocolo TBS en condiciones de VC. Cada círculo es el promedio de IPSCs obtenidos durante 5 minutos antes y después de la aplicación de ACh (**flecha roja**). Nótese la potenciación de los IPSCs que sigue al pulso de ACh. Los registros superiores son ejemplos de IPSCs registrados en una célula a distintos tiempos **1**, **2** y **3**.

Al contrario, en ausencia de corrientes de acción (ACs) (protocolo sin TBS) y fijando el potencial de la neurona piramidal a -75 mV, el pulso de ACh induce una depresión de la amplitud de los IPSCs que se estabiliza 5 min después en valores de  $42,38 \pm 12,66$  % con respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $N=4$ ) (**Figura 11**).

La aplicación de ACh induce cambios en la plasticidad sináptica que están íntimamente ligados con la actividad de la neurona postsináptica, ya que en condiciones en las que la célula se encuentra excitada, disparando corrientes de acción durante el protocolo TBS, la aplicación de ACh induce una potenciación a largo plazo del IPSC, mientras que por el contrario, en condiciones en las que la célula se encuentra en estado de silencio, ACh induce una depresión a largo plazo o LTD (**Figura 12**).



**Figura 11:** Gráfica de la amplitud de pico (% del control) de los IPSCs en función del tiempo en ausencia de TBS con el potencial de membrana fijado en  $-75$  mV. Cada círculo es el promedio de IPSCs obtenidos durante 5 minutos antes y después de la aplicación de ACh (flecha roja). La aplicación de ACh induce una depresión sostenida de los IPSCs o i-LTD.



**Figura 12:** Gráficas superpuestas de las figuras 11 y 12 mostrando las diferencias en los efectos de ACh cuando la neurona postsináptica está activa y ACh induce potenciación del IPSC (círculos negros) o en reposo y ACh induce la i-LTD (círculos blancos).

La LTD inducida por ACh en ausencia del protocolo TBS fue bloqueada por la incubación de la rodaja con AM251, agonista inverso de los receptores para endocannabinoides tipo CB<sub>1</sub> (datos no mostrados), indicando que esta LTD se debe a la

liberación de endocannabinoides que actúan retrógradamente y suprimen la liberación de GABA por parte de los terminales inhibitorios de la interneuronas CCK<sup>+</sup>, efecto que se conoce como i-LTD (Kim y col., 2002; Chevalleyre y col., 2007; Lovinger, 2008; Kano y col., 2009; Castillo y col., 2011).

Es importante destacar los efectos opuestos que induce la ACh según el estado de excitación o de reposo en que se encuentre la célula postsináptica. **Por lo tanto la actividad postsináptica actúa como una compuerta dependiente de actividad que determina el efecto final de la aplicación de ACh resultando en LTP o LTD GABAérgica.** Además se debe enfatizar que la activación postsináptica con el protocolo TBS se acerca razonablemente a la actividad theta que en ciertas condiciones conductuales está presente en células piramidales del hipocampo (Núñez y col., 1987).

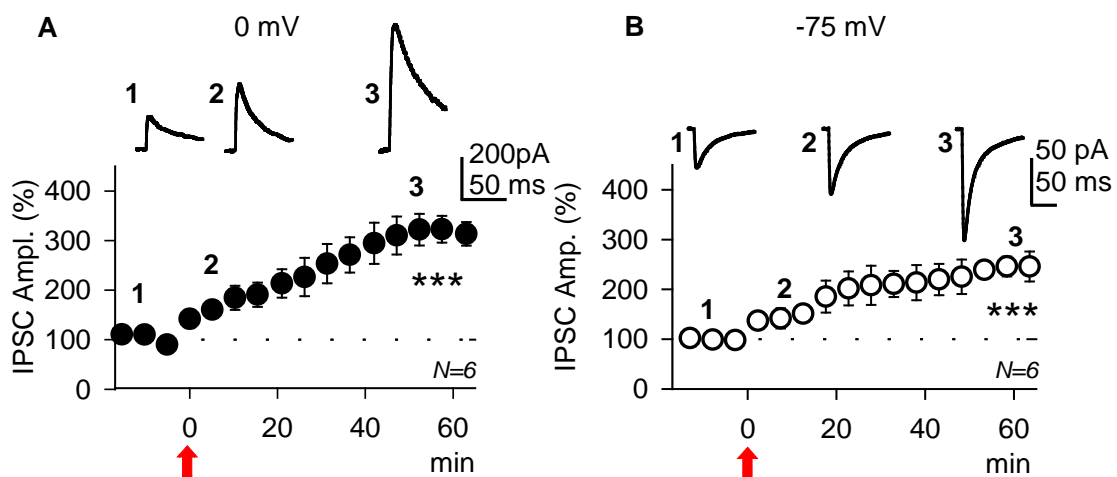
### **1.3. Efectos de las despolarizaciones sucesivas y de la ACh sobre los IPSCs.**

Estudiamos los efectos de las despolarizaciones sucesivas en combinación con la aplicación de ACh, para ello se utiliza el protocolo de despolarizaciones sucesivas que consiste en mantener la neurona durante 30 segundos a 0 mV, hecho que se repite cada 75 segundos, periodo en el cual la neurona se encuentra a -75 mV al que **llamaremos ACh y Despolarización (Ver Materiales y Métodos, apartado: 3.2.3.2).**

Durante todo este tiempo las despolarizaciones sucesivas se combinan con la estimulación eléctrica continua de las sinapsis inhibitorias a una frecuencia de 1 estímulo cada 3 segundos.

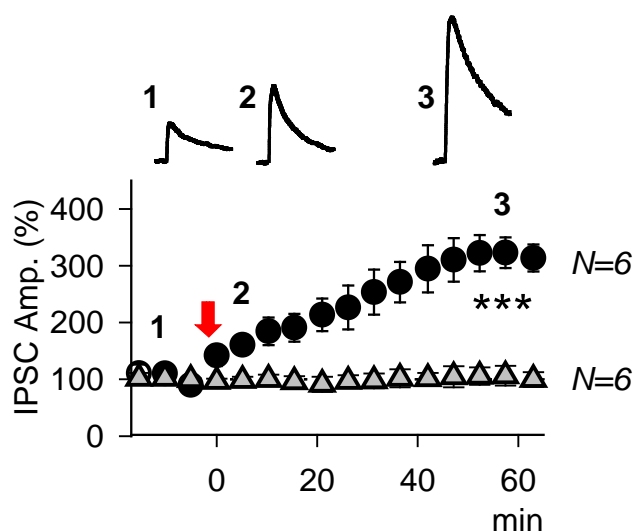
Después de un registro control, que dura 10-15 min durante los cuales se aplican despolarizaciones sucesivas, se administra el pulso de ACh que induce un aumento gradual de la amplitud de los IPSCs. A 0 mV los valores promedio de los IPSCs se incrementan hasta un  $294,12 \pm 39,72$  % con respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $N=6$ ) y para

un potencial de membrana de -75 mV los valores obtenidos son de  $245,99 \pm 30,13$  % con respecto al control ( $p < 0,001$ ; mismas células) (**Figura 13**). Por lo tanto el protocolo de despolarizaciones sucesivas combinado con la aplicación de ACh induce una importante potenciación de la inhibición que alcanza magnitud similar a 0 mV y a -75 mV.



**Figura 13:** (A) Gráfica de la amplitud de pico de los IPSCS en función del tiempo mostrando que la aplicación de ACh (flecha roja) produce una potenciación del IPSC a 0 mV (B) que es de amplitud similar a -75 mV. Cada círculo de (A) y (B) es el promedio de IPSCs obtenidos durante 5 minutos antes y después de la aplicación de ACh (flecha roja). Podemos observar que ACh y despolarizaciones sucesivas induce una LTP GABAérgica.

Como vemos, la combinación de ACh y Despolarización induce una potenciación de la inhibición, por tanto lo siguiente a determinar es qué papel juegan en toda esta fenomenología tanto la ACh como la Despolarización. Para ello, se analiza el efecto del protocolo de despolarizaciones sucesivas en ausencia del pulso de ACh. En estas condiciones, la magnitud del IPSC no se modifica siendo después de una hora de registro del  $92,38 \pm 4,58$  % con respecto al control ( $p > 0,05$ ;  $N=6$ ). Por lo tanto en ausencia de ACh no hay potenciación GABAérgica (**Figura 14**).



**Figura 14:** Gráfica de la amplitud de pico de los IPSCs en función del tiempo, mostrando que la **aplicación de ACh** (flecha roja) durante el protocolo de pulsos despolarizantes produce una **potenciación del IPSC a 0 mV (círculos)**. Por el contrario en **ausencia de ACh (triángulos)** no hay modificación de la amplitud de los IPSCs. Tanto los círculos como los rectángulos corresponden a promedios de IPSCs obtenidos durante 5 minutos.

Los resultados anteriores demuestran que **ACh y Despolarización son imprescindibles para la inducción de la LTP GABAérgica** ya que ambas presentadas aisladamente no inducen cambios en la amplitud de pico del IPSC (*Ver figuras 11, 12 y 14*).

#### **1.4 La concentración intracelular del ión $\text{Cl}^-$ no influye sobre esta plasticidad sináptica.**

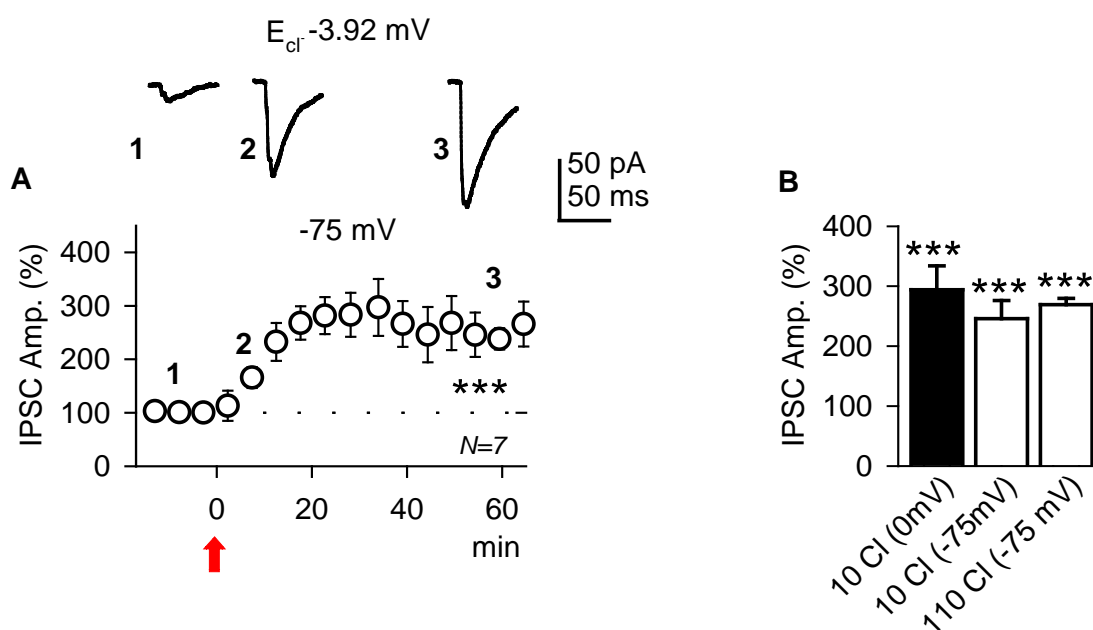
A efectos de determinar si la concentración intracelular de  $\text{Cl}^-$  influye en la potenciación del IPSC se realizan experimentos en los que se emplea, además de la solución intracelular de 10 mM de  $\text{Cl}^-$ , otra que posee una concentración de 110 mM de CsCl (*Ver Materiales y métodos; apartado: 3.2.1.2*).

Posibles cambios en la concentración intracelular del ión pueden modificar la inhibición GABAérgica porque modifica la fuerza electromotriz del ión. Según la ley de Ohm:  $I = g (V - E_{Cl^-})$ , siendo “ $I$ ” la intensidad de corriente; “ $g$ ” la conductancia del ión que a su vez se corresponde con la inversa de la resistencia ( $1/R$ ) y ( $V - E_{Cl^-}$ ) la fuerza electromotriz del ión y resulta de restar el potencial de equilibrio del ión, en este caso el cloro, al potencial de membrana “ $V$ ” al que se encuentra la célula. Cuanto más alejados se encuentren estos valores mayor será la entrada o la salida del ión de la célula. **Si por alguna razón a lo largo de nuestro abordaje experimental cambiase la concentración intracelular de cloro, cambiaría también la fuerza electromotriz del ión, y entonces el IPSC podría ver afectada su amplitud.** Por eso es importante realizar este control de nuestro abordaje experimental.

La concentración extracelular de  $Cl^-$  bajo nuestras condiciones experimentales es de 128,69 mM. Para una **concentración intracelular de cloro 10 mM** y a temperatura ambiente (20-22°C), la ecuación de Nerst revela un  $E_{Cl^-}$  de -64,75 mV. Luego cuando la célula se encuentra en un potencial de membrana de -75mV, la corriente es de entrada y pequeña (por mucho que estímulos eléctricamente) ya que la fuerza electromotriz del ión tiene signo positivo y un valor muy bajo y en cambio para un potencial de membrana de 0 mV, la corriente observada será de salida (signo negativo) y más grande.

Para una **concentración intracelular de 110 mM de  $Cl^-$**  y con la misma concentración extracelular (128,69 mM de  $Cl^-$ ), a temperatura ambiente (20-22 °C), el  $E_{Cl^-}$  es -3,92. mV. Bajo estas condiciones, cuando la célula está a un potencial de membrana de -75 mV, los IPSCs son corrientes de entrada cuya magnitud en situación control se encuentran en valores de  $-52,80 \pm 10,43$  pA ( $N=7$ ). Al realizar el protocolo de despolarizaciones sucesivas y ACh, se obtiene una potenciación sostenida en el

tiempo del  $269,26 \pm 10,50$  % con respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $N=7$ ) para un potencial de membrana en reposo de  $-75$  mV (*Figura 15*). Por lo tanto podemos concluir que los efectos de ACh y Despolarización no dependen de la concentración intracelular del ión  $\text{Cl}^-$ .



**Figura 15:** (A) Gráfica de la amplitud de pico (% del control) de los IPSCs en función del tiempo empleando la concentración intracelular de 110 mM de  $\text{Cl}^-$  ( $E_{\text{Cl}^-}$  de  $-3.92$  mV). Cada círculo es el promedio de los IPSCs obtenidos durante 5 minutos antes y después de la aplicación de ACh (flecha roja). La aplicación de ACh induce una potenciación sostenida de los IPSCs similar a la obtenida con la solución intracelular con una concentración de 10 mM de  $\text{Cl}^-$  (B): La grafica de barras corresponde a los resultados obtenidos en la *Figura 13* y en *15A*, la barra negra muestra el porcentaje de potenciación del IPSC a 0 mV con 10 mM de  $\text{Cl}^-$  ( $N=6$ ), mientras que en blanco se muestran los resultados obtenidos a  $-75$  mV para 10 mM de  $\text{Cl}^-$  ( $N=6$ ) y para 110 mM de  $\text{Cl}^-$  ( $N=7$ ). Comparando ambos resultados vemos que para ambas concentraciones intracelulares de  $\text{Cl}^-$  se produce una potenciación estadísticamente significativa y de magnitud similar a  $-75$  y 0 mV ( $p < 0,001$  (\*\*\*)).

Además, en el caso de la solución intracelular 10 mM de  $\text{Cl}^-$  la pipeta contiene  $\text{K}(\text{MeSO})_4$ , mientras que en el caso de la solución de 110 mM de  $\text{Cl}^-$  posee  $\text{Cs}^+$  (Ver

**materiales y métodos 3.2.1.2).** El ión  $\text{Cs}^+$  bloquea las corrientes de  $\text{K}^+$ , por lo que **cambios en las conductancias del ión  $\text{K}^+$  no contribuyen a los efectos de ACh y Despolarización sobre la transmisión GABAérgica.**

Hay autores que han descrito que la entrada de  $\text{Cl}^-$  a través del receptor  $\text{GABA}_A$  produce la salida del ión  $\text{HCO}_3^-$  (Kaila y col., 1993). Además, la influencia del  $\text{HCO}_3^-$  es mínima a altas concentraciones intracelulares de  $\text{Cl}^-$  (Farrant y Kaila, 2007), pero no así a bajas concentraciones (como en el caso de 10 mM de  $\text{Cl}^-$ ) donde sí podría estar influyendo. Como los resultados obtenidos con las soluciones intracelulares de alta y baja concentración de  $\text{Cl}^-$  son esencialmente idénticos, resulta que los cambios en la permeabilidad a  $\text{HCO}_3^-$  a través de los receptores  $\text{GABA}_A$  no influyen en la potenciación de los IPSCs inducida por la acción combinada de ACh y Despolarización.

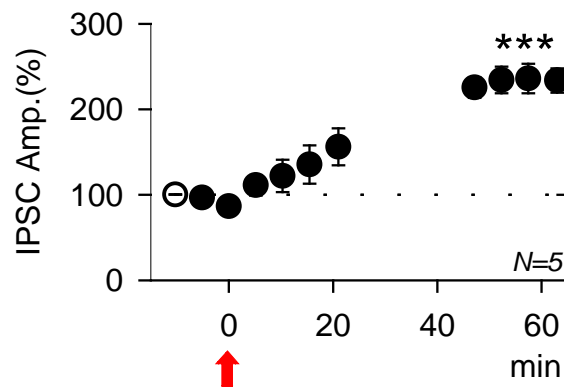
#### **1.5. La activación de las sinapsis inhibitorias es necesaria para la inducción de la LTP GABAérgica, pero no para su mantenimiento.**

Otros autores han descrito que los cambios a largo plazo (LTP y LTD) en la transmisión sináptica persisten después de la inducción, aún en ausencia de la estimulación sináptica (Nguyen y col., 1994; Collin y col., 1995; Malleret y col., 2001). Para determinar si este fenómeno ocurría con la potenciación de la inhibición inducida por el protocolo de ACh y Despolarización, una vez inducida la potenciación, la estimulación inhibitoria se interrumpió transitoriamente durante 20 minutos (**Figura 16**). Al reanudar la estimulación los IPSCs eran de mayor amplitud que los registrados antes de la interrupción de la estimulación eléctrica, llegando a adquirir valores de  $234,72 \pm 15,34\%$  con respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $N=5$ ) (**Figura 16**).

**Los resultados anteriormente descritos tomados en conjunto indican que la inducción de la LTP de la inhibición GABAérgica requiere la activación de**



receptores colinérgicos y la despolarización repetida de la neurona postsináptica. Por el contrario esta LTP no se acompaña de cambios en el potencial de reversión del ión cloro y una vez expresada la LTP no requiere la activación de las sinapsis inhibitorias GABAérgicas para su mantenimiento.



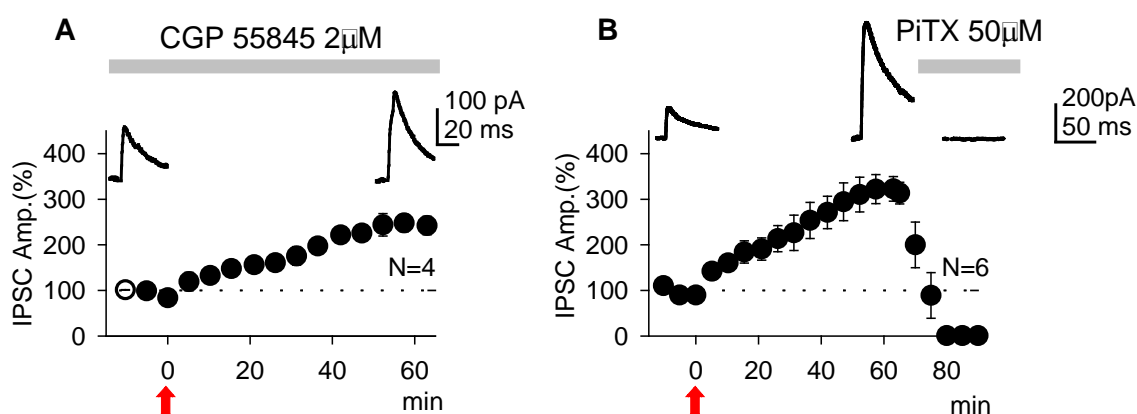
**Figura 16:** Gráfica de la amplitud de pico de los IPSCs en función del tiempo mostrando que luego de la inducción de la potenciación la interrupción de la estimulación inhibitoria no suprime la potenciación de los IPSCs, que continúa al reanudar la estimulación inhibitoria. La flecha roja indica la aplicación de ACh y los círculos negros corresponden con los promedios de los IPSCs obtenidos cada 5 minutos (como en las figuras anteriores).

### 1.6. La actividad combinada de ACh y Despolarización modifica los IPSC a través de receptores GABA<sub>A</sub>.

En nuestras condiciones experimentales, al estimular eléctricamente en SR, podemos activar tanto la transmisión sináptica inhibitoria GABA<sub>A</sub>, como la GABA<sub>B</sub> o ambas simultáneamente. Para determinar cuál es el tipo de receptor que induce la potenciación, aislamos ambos tipos de respuestas GABA usando los antagonistas específicos de los receptores GABAérgicos correspondientes PiTX, inhibidor alostérico de los receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>Rs) y CGP 55845, antagonista específico de los receptores GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>Rs).

Con el protocolo ACh y Despolarización y la solución intracelular de 10 mM de  $\text{Cl}^-$  se incubaba la rodaja con CGP 55845 (2  $\mu\text{M}$ ), aislándose así la transmisión  $\text{GABA}_A$ . En estas condiciones la potenciación de los IPSCs alcanza valores de  $233,39 \pm 28,88 \%$  con respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $N=6$ ) y de magnitud esencialmente idéntica a la obtenida en ausencia de CGP 55845 (*Figura 17A*). Por lo tanto **los  $\text{GABA}_B\text{Rs}$  no contribuyen a este modo de potenciación GABAérgica.**

Para determinar si la expresión de la potenciación se debe exclusivamente al incremento de la eficacia de las sinapsis  $\text{GABA}_A$ , se perfunde PiTX (50  $\mu\text{M}$ ) después de la aplicación de ACh una vez inducida la LTP de los IPSCs. La aplicación de PiTX suprime los IPSCs ( $2,06 \pm 3,94 \text{ pA}$  ó  $1,05 \pm 2,12 \%$ ;  $p > 0,05$ ;  $N=6$ ) (*Figura 17B*).



**Figura 17:** Gráfica de la amplitud de pico (% del control) de los IPSCs en función del tiempo mostrando que: (A) La incubación con CGP 55845 (2  $\mu\text{M}$ ) no impide la LTP; (B) Una vez inducida la LTP la aplicación en el baño de PiTX (50  $\mu\text{M}$ ) suprime los IPSCs. La flecha roja y los círculos significan lo mismo que en las figuras anteriores.

Estos resultados sugieren que en estas condiciones experimentales la activación de los  $\text{GABA}_B\text{Rs}$  no contribuye a la potenciación de los IPSCs GABAérgicos. Además los resultados indican que **la potenciación es causada exclusivamente por un**

**aumento de la eficacia de las sinapsis GABA<sub>A</sub> (Figura 17).** Por lo que de ahora en adelante, llamaremos a esta potenciación a largo plazo: **GABA<sub>A</sub>-LTP**.

### **1.7. Los efectos combinados de ACh y Despolarización requieren la activación M1-mAChRs, pero no de M2-mAChRs ni $\alpha 7$ -nAChRs.**

Fernández de Sevilla y col., 2008 describen un nuevo tipo de plasticidad sináptica excitadora en célula piramidales de CA1 de hipocampo, no *hebbiana*, inducida por la producción intracelular de IP<sub>3</sub> mediada por la activación de M1-mAChRs. Este tipo de plasticidad es denominado LTP<sub>IP3</sub>.

Es factible que la LTP-GABA<sub>A</sub> se deba a mecanismos similares, por lo que se emplea en perfusión los siguientes agentes farmacológicos: (i) Atropina, antagonista de amplio espectro (0,3 $\mu$ M) de los mAChRs, (ii) Pirenzepina, antagonista específico de los M1-mAChRs (75 nM) y (iii) Metoctramina, antagonista específico de los M2-mAChRs. (Fukudome y col., 2004).

La LTP-GABA<sub>A</sub> no se induce en presencia de atropina en el baño, alcanzando la amplitud de pico de los IPSCs valores de  $94,78 \pm 2,84\%$  con respecto al control ( $p > 0,05$ ,  $N=6$ ) después de la aplicación de ACh. Los efectos de pirenzepina fueron similares siendo la amplitud de pico de los IPSCs de  $99,65 \pm 14,15\%$  respecto al control ( $p > 0,05$ ;  $N = 7$ ). Por el contrario la metoctramina no suprimió la LTP-GABA<sub>A</sub>, alcanzando la amplitud de pico de los IPSCs potenciados por ACh valores de  $231,41 \pm 7,75\%$  con respecto al control ( $p > 0,001$ ;  $N=4$ ) (**Figura 18**). Por lo tanto, la activación de M1-mAChRs es necesaria para la inducción de GABA<sub>A</sub>-LTP, no siendo requerida la contribución de M2-mAChRs.

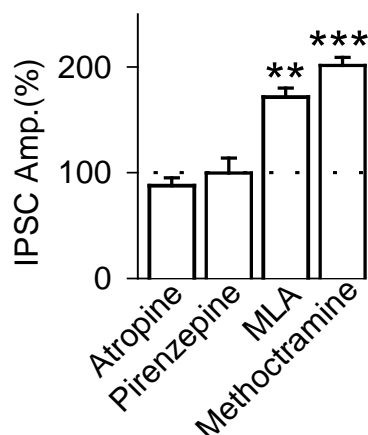
Existe controversia sobre la presencia y la actividad de los receptores colinérgicos nicotínicos que poseen la subunidad  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ -nAChRs) en las neuronas

piramidales de CA1 de hipocampo (Frazier y col., 1998). Sin embargo los  $\alpha 7$ -nAChRs son abundantes en interneuronas inhibitorias del SR donde ejercen acciones excitadoras y regulan la liberación de GABA. (Alkondon y col., 1996; McQuiston y Madison, 1999; Khiroug y col., 2003; Morales y col., 2008; Cea-del Rio y col., 2010).

En nuestras condiciones experimentales, la aplicación de ACh se realiza mediante un pulso breve en la dendrita apical de CA1 y además, se introduce la pipeta de microiontoforesis en el tejido para la aplicación de la ACh y se retira del mismo después de su aplicación. De esta manera se pretenden limitar los efectos de dicha ACh a la neurona piramidal registrada y disminuir así, la posible liberación no deseada. (Fernández de Sevilla y col., 2008; Fernández de Sevilla y Buno, 2010). A pesar de estas precauciones, la aplicación de ACh podría activar los receptores nAChs y los mAChRs en interneuronas cercanas y modificar así, la liberación de GABA por esas interneuronas (Khiroug y col., 2003; Freund y Katona, 2007; Cea-del Rio y col., 2010).

Para determinar una posible implicación de los  $\alpha 7$  -nAChRs, comprobamos el efecto del inhibidor específico de dichos  $\alpha 7$  -nAChRs, el MLA (125  $\mu$ M) y observamos que éste no interfiere con la LTP-GABA<sub>A</sub> adquiriendo los IPSCs potenciados una amplitud de pico de  $171,61 \pm 8,45$  % con respecto a los controles; ( $p < 0,01$ ;  $N=4$ ) (*Figura 18.*). **Lo que sugiere que la regulación por  $\alpha 7$  -nAChRs de la liberación de GABA por parte de las interneuronas no tiene efecto sobre la GABA<sub>A</sub>-LTP.** Este experimento también excluye una posible, aunque discutida, contribución de  $\alpha 7$  -nAChRs en las neuronas piramidales.

Por lo tanto **la activación de M1-mAChRs es necesaria para la inducción de GABA<sub>A</sub>-LTP, no siendo requerida la contribución de M2-mAChRs ni de los  $\alpha 7$ -nAChRs.**



**Figura 18:** Amplitud de pico del IPSC (% del control)

después 30 min de la aplicación de ACh en presencia de: *Atropina* (N=6); y *Pirenzepina* (N=7). En ambos casos no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con respecto a los controles (línea discontinua); *MLA* (N=4) bloqueante específico de los  $\alpha 7$ -nAChRs; *Metoctramina* (N=4) bloqueante específico de los M2-mAChRs. En ambos casos no se interfiere con la GABA<sub>A</sub>-LTP ( $p > 0,05$ ). Estos resultados indican que ACh actúa a través de la activación de los M1-mAChRs.

### 1.8. El efecto combinado de ACh y Despolarización requiere un aumento del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular.

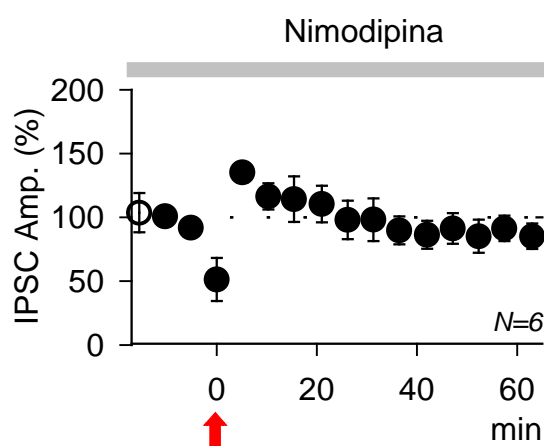
Se han descrito diferentes fenómenos plásticos en los que está involucrado el calcio intracelular. (Revisado en Zucker, 1999, ) y este calcio además, puede modificar las propiedades biofísicas del GABA<sub>A</sub>R (Ormond y Woodin, 2011).

Los efectos, tanto de la ACh como de la despolarización, tienen como consecuencia un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Dicho aumento se debe a que: (i) cuando la ACh se une a los mAChRs se produce el bloqueo de las conductancias de  $\text{K}^+$ , lo que en condiciones de VC hace a la célula eléctricamente más compacta, facilitando el control de voltaje y en condiciones de CC produce una despolarización; (ii) la activación de los mAChRs tiene como consecuencia la movilización de la PLC de la membrana al citoplasma induciéndose la producción de  $\text{IP}_3$  que se une a sus receptores ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) localizados en los reservorios intracelulares, liberándose  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático; y (iii) la activación directa de los VGCCs debido las despolarizaciones sucesivas impuestas por el protocolo utilizado induce entrada de calcio.

Por lo tanto creemos conveniente estudiar los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$ , para ello en primer lugar bloqueamos los VGCC tipo L con su antagonista nimodipina. Realizamos

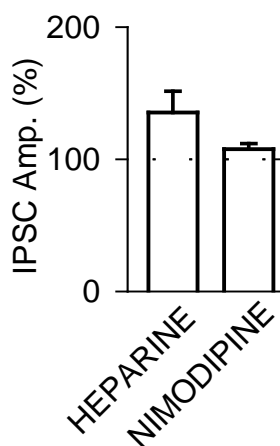
el protocolo de ACh y Despolarización, con la solución intracelular de 10 mM de  $\text{Cl}^-$ , en presencia de nimodipina (10  $\mu\text{M}$ ) en el baño y observamos que induce la supresión de la potenciación del IPSC ( $107, 57 \pm 4,01$  % de los controles;  $p > 0,05$ ;  $N=6$ ) (**Figura 19**), lo que indica que el **influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  es debido a la activación de los VGCC tipo L** y que **éste es la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  requerida para que se induzca la  $\text{GABA}_A$ -LTP**.

**Figura 19:** Gráfica de la amplitud de pico de los IPSCs en función del tiempo y en presencia de **nimodipina**, mostrando que la aplicación de ACh (flecha roja) abole la potenciación del IPSC. Cada círculo es el promedio de IPSCs obtenidos durante 5 minutos (al igual que en la gráficas anteriores).



A la vista de los resultados, la entrada del ión calcio a través de los VGCC tipo L que se activan durante la despolarización, es fundamental para inducir este fenómeno plástico. Pero no sabemos qué ocurre con el calcio intracelular y éste puede estar interviniendo también ya que la activación de los mAChRs finalmente induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la activación de los receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) localizados en el retículo. Al bloquear los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a  $\text{IP}_3$  con heparina en la solución intracelular (5mg/ml) se produce un ligero incremento del IPSC, que no resulta estadísticamente significativo, por lo tanto no se produce potenciación ( $135,32 \pm 16,16$  % con respecto al control;  $p > 0,05$ ;  $N=4$ ) (**Figura 20**).

Estos resultados sugieren que un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es clave en la inducción de los efectos de ACh y Despolarización y que dicho calcio entra a través de los VGCC tipo L y que además se está liberando desde en el interior celular a través de los  $\text{IP}_3\text{Rs}$ .



**Figura 20:** Amplitud de pico del IPSC (% del control) después de 30 min de la aplicación de ACh en presencia de *Heparina intracelular* para antagonizar con los  $\text{IP}_3\text{Rs}$  ( $N=4$ ) y *Nimodipina* en el baño para bloquear los VGCC tipo L ( $N=6$ ). Nótese la completa inhibición de la  $\text{GABA}_A\text{-LTP}$  al bloquear los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y los  $\text{IP}_3\text{Rs}$ .

### 1.9. La potenciación GABAérgica induce voltaje dependencia de los IPSCs.

Se ha descrito que bajo determinadas circunstancias y dependiendo del tipo de subunidades que lo conformen, el receptor  $\text{GABA}_A$  puede presentar voltaje dependencia (Birbir y col., 1994; Eghbali y col., 1997). Por ello vamos a analizar el comportamiento del receptor  $\text{GABA}_A$  durante la  $\text{GABA}_A\text{-LTP}$ , mediante el estudio de la relación que existe entre la amplitud del IPSC y el potencial de membrana, es decir el estudio de la relación I/V.

Se ha demostrado que en la región extrasináptica existe una gran proporción de receptores  $\text{GABA}_A$  de cinética lenta y alta sensibilidad a GABA que pueden desplazarse lateralmente hacia las sinapsis modificando así, la eficacia de las sinapsis inhibitorias. Además, estos receptores extrasinápticos presentan una voltaje dependencia caracterizada por una marcada rectificación de salida (Birbir y col., 1994; Eghbali y

col., 1997) Por lo tanto analizamos si paralelamente al desarrollo de la GABA<sub>A</sub>-LTP se producen cambios en la cinética de los IPSCs.

Para ello empleamos los protocolos descritos en *materiales y métodos*, **apartado: 3.2.3.4**, que estudian las variaciones de amplitud del IPSC frente a cambios en el voltaje de membrana (relación I/V). Como se indica en el **apartado 3.2.1.1 (ver materiales y métodos)**, para una concentración intracelular de 10mM de Cl<sup>-</sup> y una concentración en el LCA de Cl<sup>-</sup> de 128,69 mM y a temperatura ambiente (20-22°C), la ecuación de Nerst revela un  $E_{Cl^-}$  de -64,75 mV. Además la relación I/V nos permite volver a confirmar que efectivamente no se producen cambios en el  $E_{Cl^-}$ .

Los protocolos empleados para estudiar la relación I/V se realizan partiendo de un potencial de membrana de 0 mV y tras la aplicación de ACh, observamos que efectivamente el  $E_{Cl^-}$  no cambia durante todo el tiempo que dura el experimento y se sitúa en valores cercanos a -60 mV (**Figura 21**), coincidiendo con el potencial de equilibrio calculado de -64,75 mV.

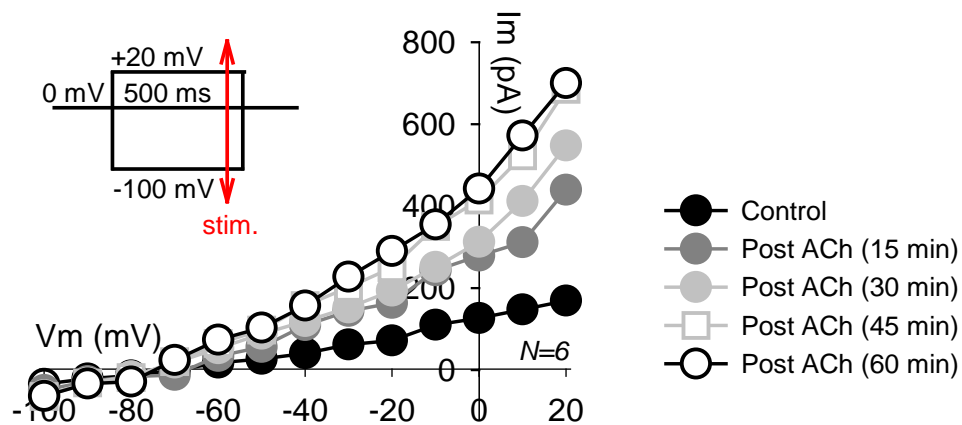
En la **Figura 21**, después de la aplicación de ACh podemos observar: (i) un aumento de la pendiente de dicha relación (I/V); (ii) una marcada rectificación de salida, que se acentúa especialmente a valores de potencial de membrana en reposo mas despolarizados por encima de  $\approx -40$  mV; y (iii) la potenciación del IPSC.

El aumento de la pendiente de la relación I/V revela una acentuación de la conductancia del receptor GABA<sub>A</sub> al ión Cl<sup>-</sup>, aumento inducido por la aplicación del pulso de ACh.

**El aumento de la pendiente y la aparición de la marcada rectificación indican una mayor sensibilidad a GABA en función del voltaje de membrana.** Este punto resulta muy importante puesto que pone de manifiesto que podrían estar



ingresando en la sinapsis receptores nuevos (ya sea por exocitosis vesicular o por el movimiento lateral de receptores extrasinápticos por la superficie celular).



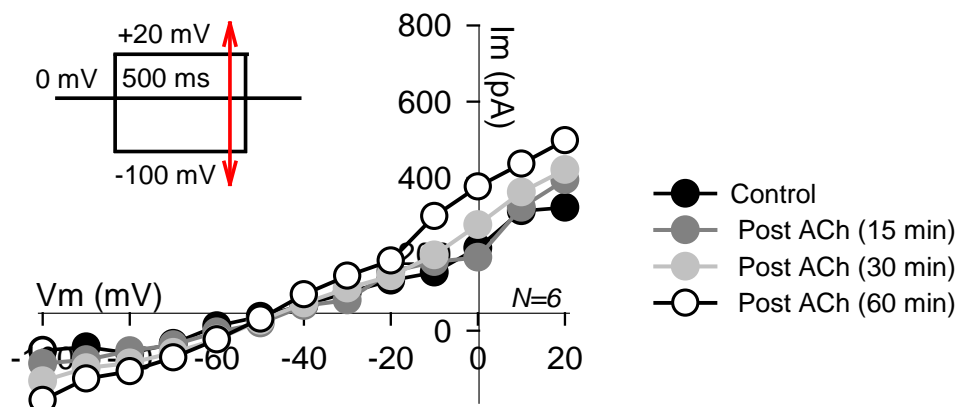
**Figura 21:** Relaciones I/V control y a tiempos crecientes después de la aplicación del pulso de ACh. La situación control muestra una relación lineal y a partir de la aplicación de ACh surge una rectificación de salida que aumenta en el tiempo. La pendiente de la relación aumenta indicando una creciente conductancia media en función del voltaje de membrana que va aumentando en función del tiempo.

A la vista de estos resultados nos centraremos en la evolución a lo largo del tiempo de la relación I/V partiendo de un potencial de membrana en reposo de 0 mV (**Figura 21**). Si la evolución fuese gradual conferiría un aumento del número de receptores extrasinápticos en la sinapsis. Observamos que a los 15 minutos de la aplicación de ACh ya aparece claramente la rectificación y aumenta la pendiente de la relación I/V. Además, este fenómeno crece constantemente hasta que a los 45-60 min se estabiliza. Este comportamiento es similar en el tiempo a lo que ocurre con la potenciación del IPSC (*Ver figura 13*).

### **1.9.1. La voltaje dependencia de los IPSCs se debe al aumento de calcio intracelular.**

Dado que la despolarización y la ACh pueden inducir un aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  produciendo: (i) un aumento de la sensibilidad a GABA de los  $\text{GABA}_A$ Rs (Kano y col., 1996; Ransom y col., 2010); y (ii) que a través de la activación de los mAChRs se produce una potente ola de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Nakamura y col., 1999; Fernández de Sevilla y col., 2008) es factible que el calcio se revele como el posible candidato responsable de la aparición de la rectificación en función del voltaje de membrana (de la rectificación voltaje dependiente).

Para determinar la importancia del aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en la relación I/V, estudiamos lo que sucede en presencia de BAPTA intracelular fijando el voltaje de inicio a 0 mV. Bajo estas condiciones experimentales, el BAPTA inhibe los cambios en las relaciones I/V inducidas por el protocolo de ACh y Despolarización, indicando que el aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  contribuye de forma determinante a los cambios de las propiedades de los  $\text{GABA}_A$ Rs. Se demuestra, así, que **el ión  $\text{Ca}^{2+}$  es un factor esencial en la modulación postsináptica de la eficacia sináptica de la inhibición en las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo (Figura 22).**



**Figura 22:** Relación  $I/V$  en presencia de BAPTA en la solución intracelular en el control (círculos negros), 30 min y (círculos blancos) y 60 min (círculos grises) de la aplicación de ACh ( $N=6$ ). BAPTA inhibe el cambio en la voltaje dependencia de los  $GABA_A$ Rs inducido por ACh.

### 1.10. Mecanismos intracelulares que contribuyen a la $GABA_A$ -LTP.

La actividad de las enzimas CamKII, PKC y PKA, está relacionada con receptores acoplados a proteína G y con cambios persistentes en la plasticidad sináptica, como por ejemplo es el caso de la PKC que cuando la ACh se une a su receptor M1-mAChR, activa a la PLC y ésta genera DAG en la  $LTP_{IP3}$  en neuronas piramidales de CA1 (Fernández de Sevilla y col., 2008; Fernández de Sevilla y Buño, 2010). Además, los niveles de activación tanto de PKC y PKA pueden aumentar o disminuir la amplitud de los IPSCs (Poisbeau y col., 1999).

Por estas razones, analizamos los efectos de bloquear en la célula de registro, la actividad de dichas enzimas y de las proteínas G con inhibidores específicos. Para ello se emplea el protocolo de ACh y Despolarización con la solución intracelular de 10 mM de  $Cl^-$ .

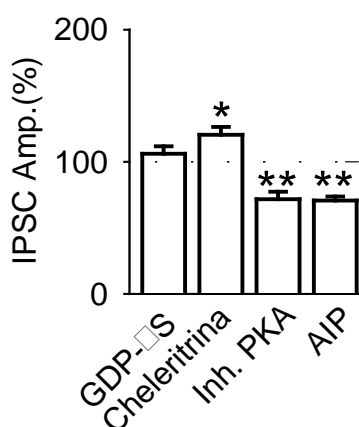
En primer lugar usamos GDP $\beta$ S, inhibidor de proteína G (2 mM) en la solución intracelular lo que suprime los efectos de ACh y Despolarización, llegando la amplitud de pico del IPSC a valores medios de  $105,95 \pm 5,72$  % con respecto al control ( $p < 0,05$ ;

$N=6$ ), lo que indica que **es necesaria la activación de proteínas G para la generación de la GABA<sub>A</sub>-LTP (Figura 23).**

Posteriormente se inhibe PKC con cheleritrina (1  $\mu$ M) produciéndose una reducción de la GABA<sub>A</sub>-LTP de  $120,46 \pm 5,95\%$  con respecto a los controles, ( $p < 0,05$ ;  $N=6$ ) (**Figura 23**).

El estudio de los efectos del bloqueo de PKA con el inhibidor de PKA (fragmento del 6 al 22) (10  $\mu$ M) induce una depresión del IPSC de  $71,57 \pm 5,67\%$  con respecto a la situación control ( $p < 0,01$ ;  $N=4$ ) (**Figura 23**).

También se emplea el péptido AIP (10  $\mu$ M), que bloquea la actividad de la CamKII que impide la inducción de la GABA<sub>A</sub>-LTP mediada por la ACh y Despolarización reduciendo la amplitud de pico del IPSC un  $70,68 \pm 2,92\%$  con respecto a los controles ( $p < 0,01$ ;  $N=4$ ) (**Figura 23**).



**Por lo tanto PKA y CamKII tiene una contribución importante en la GABA<sub>A</sub>-LTP, mientras que PKC tiene menos importancia.**

**Figura 23:** Grafica de barras mostrando los efectos de: **GDP-βS**, inhibidor de proteínas G (42mM;  $N=6$ ); **Cheleritrina** bloqueante de la PKC (1 $\mu$ M;  $N=6$ ); **3** inhibidor de PKA (fragmento del 6 al 22) (10  $\mu$ M;  $N=4$ ); **4-AIP**: péptido inhibidor de la CamKII (10  $\mu$ M;  $N=4$ ) sobre la GABA<sub>A</sub>-LTP.

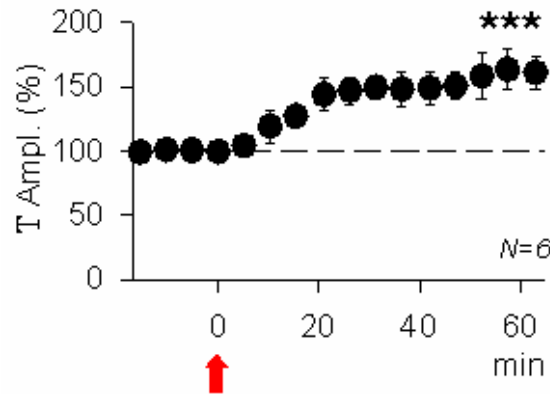
### 1.11. Inserción de nuevos receptores GABA<sub>A</sub> y/o traslocación de receptores extrasinápticos.

Se sabe que el GABA satura los receptores GABA<sub>A</sub>, por lo que un aumento en la eficacia sináptica inhibitoria solo puede deberse al incremento del número de receptores GABA<sub>A</sub> en la sinapsis (Nusser y col., 1997; Rannals y Kapur, 2011). El aumento del número de receptores GABA<sub>A</sub> en la sinapsis podría deberse a: *(i)* la inserción de nuevos receptores GABA<sub>A</sub> transportados por endosomas; *(ii)* difusión lateral hacia la sinapsis de receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos preexistentes; *(iii)* modificaciones biofísicas y/o a la sensibilidad a GABA de los receptores GABA<sub>A</sub> preexistentes en la sinapsis; y *(iv)* una disminución en la tasa de internalización de los GABA<sub>A</sub>Rs.

Se ha demostrado que en la región extrasináptica existe una gran proporción de receptores de cinética lenta y alta sensibilidad a GABA que pueden desplazarse lateralmente hacia las sinapsis modificando así la eficacia de las sinapsis inhibitorias. Además estos receptores extrasinápticos presentan una voltaje dependencia caracterizada por una marcada rectificación de salida (Birnir y col., 1994; Eghbali y col., 1997). Por lo tanto analizamos si paralelamente al desarrollo de la GABA<sub>A</sub>-LTP se producen cambios en la cinética de los IPSCs. Es importante destacar que en estas condiciones control la proporción de receptores de cinética lenta se encuentran en baja proporción en la sinapsis.

Durante la realización de los experimentos con el protocolo de ACh y Despolarización se observa que la constante de tiempo de la pendiente de caída o *Tau* (*T*) del IPSC va aumentando, es decir que la respuesta se va haciendo más lenta y duradera a medida que aumenta la GABA<sub>A</sub>-LTP. Los resultados obtenidos para la *T* de los IPSCs registrados a 0 mV es un tiempo promedio de 29,45 ms en condiciones control y que se incrementa hasta 49,45 ms  $\approx$  60 min post ACh ( $166,32 \pm 9,45$  % con

respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $N=6$ ) (**Figura 24**). Esto es importante ya que puede estar indicando un aumento del número de receptores con cinética lenta en la sinapsis.



**Figura 24:** Gráfica de del valor medio de  $T$  en función del tiempo respecto del control, mostrando que la aplicación de ACh durante el protocolo de pulsos despolarizantes produce un aumento de la  $T$  ( $p < 0,001$  (\*\*\*)). Los círculos negros son los promedios obtenidos cada 5 minutos de las  $T$  de los IPSCs y la flecha roja indica la aplicación de ACh.

Por ello en los siguientes apartados analizaremos detenidamente la posible causa del aumento de la  $T$  del IPSC.

### 1.11.1. La acción combinada de ACh y Despolarización no induce la inserción de receptores GABA<sub>A</sub> transportados por vesículas.

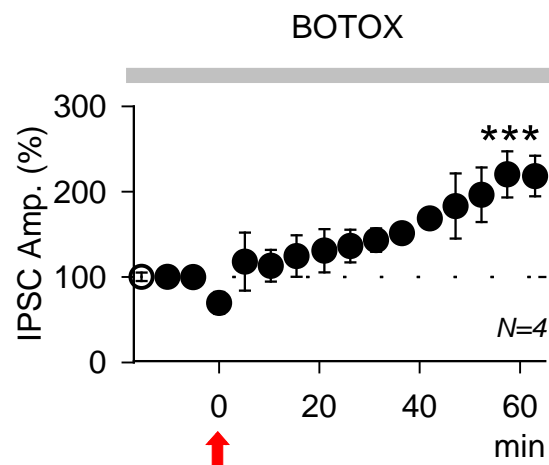
Nos preguntamos si el aumento del número de los GABA<sub>A</sub>Rs es debido a la inserción *de novo* mediante la exocitosis de receptores GABA<sub>A</sub> transportados por endosomas. El subtipo B de la toxina botulínica produce la escisión proteolítica de una de las proteínas que forman el complejo SNARE, en concreto la VAMP/sinaptobrevina (Schiavo y col., 2000), impidiendo el normal funcionamiento del mecanismo de exocitosis lo que inhibe la fusión de vesículas que transportan a los receptores GABA<sub>A</sub> hasta la membrana plasmática y la sinapsis.

El tratamiento con toxina botulínica tipo B (BOTOX) ( $0,5 \mu\text{M}$ ) añadida a la solución intracelular no modifica la  $\text{GABA}_A$ -LTP, ya que la amplitud de pico del IPSC alcanza valores de  $211,12 \pm 31,37$  con respecto a la situación control ( $p < 0,001$ ;  $N=4$ ) (**Figura 25**), valor de potenciación similar al obtenido en condiciones control. Además el BOTOX no modifica la transmisión  $\text{GABA}_A$ érgica basal ( $p > 0,05$ ;  $N=4$ ; datos no mostrados).

Estos resultados revelan que el aumento del número de receptores  $\text{GABA}_A$  en la sinapsis no se debe a la inserción de *novos* de los receptores  $\text{GABA}_A$  procedentes del interior celular.

Estos datos no excluyen que ACh impida la endocitosis que es insensible a BOTOX, lo que aumentaría el número de  $\text{GABA}_A$ Rs en las sinapsis, como ocurre en células en cultivo de la médula espinal (Neale y col., 1999).

**Figura 25:** Gráfica de la amplitud de pico de los IPSCs en función del tiempo con toxina botulínica tipo B **BOTOX** ( $0,5 \mu\text{M}$ ) en la solución **intracelular** ( $N=4$ ), mostrando la ausencia de cambios debidos a la aplicación del protocolo ACh y Despolarización respecto de la  $\text{GABA}_A$ -LTP que se induce en condiciones control, indicando que durante la  $\text{GABA}_A$ -LTP no se insertan nuevos de receptores  $\text{GABA}_A$  en las sinapsis.



Aunque el aumento de receptores en la sinápsis no se deba a la fusión de vesículas, podría ser debido a: (i) la difusión lateral de receptores  $\text{GABA}_A$  extrasinápticos preexistentes (de cinética lenta) hacia la sinapsis (Bogdanov y col., 2006; Jacob y col., 2008; Bannai y col., 2009; Saliba y col., 2009; revisado en Luscher y

col., 2011); o a (ii) modificaciones biofísicas y/o a la sensibilidad a GABA de los receptores GABA<sub>A</sub> preexistentes en la sinápsis (Ormond y Woodin, 2011).

### **1.11.2. La acción combinada de ACh y Despolarización produce el desplazamiento de receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos hacia la sinapsis.**

A la vista de los resultados obtenidos con BOTOX intracelular, la hipótesis que cobra más solidez es que el aumento de la amplitud de pico del IPSC y de la duración de la *T* de caída del IPSC que caracterizan las respuestas sinápticas de la GABA<sub>A</sub>-LTP se deba al incremento del número de receptores extrasinápticos con una mayor sensibilidad al GABA y con *T* de caída lenta. **Por lo tanto el cambio en la amplitud y cinética de los IPSCs durante la GABA<sub>A</sub>-LTP indicaría que GABA<sub>A</sub>Rs extrasinápticos se integran en la sinapsis por difusión lateral** (Banks y Pearce, 2000; Brickley y Mody, 2012).

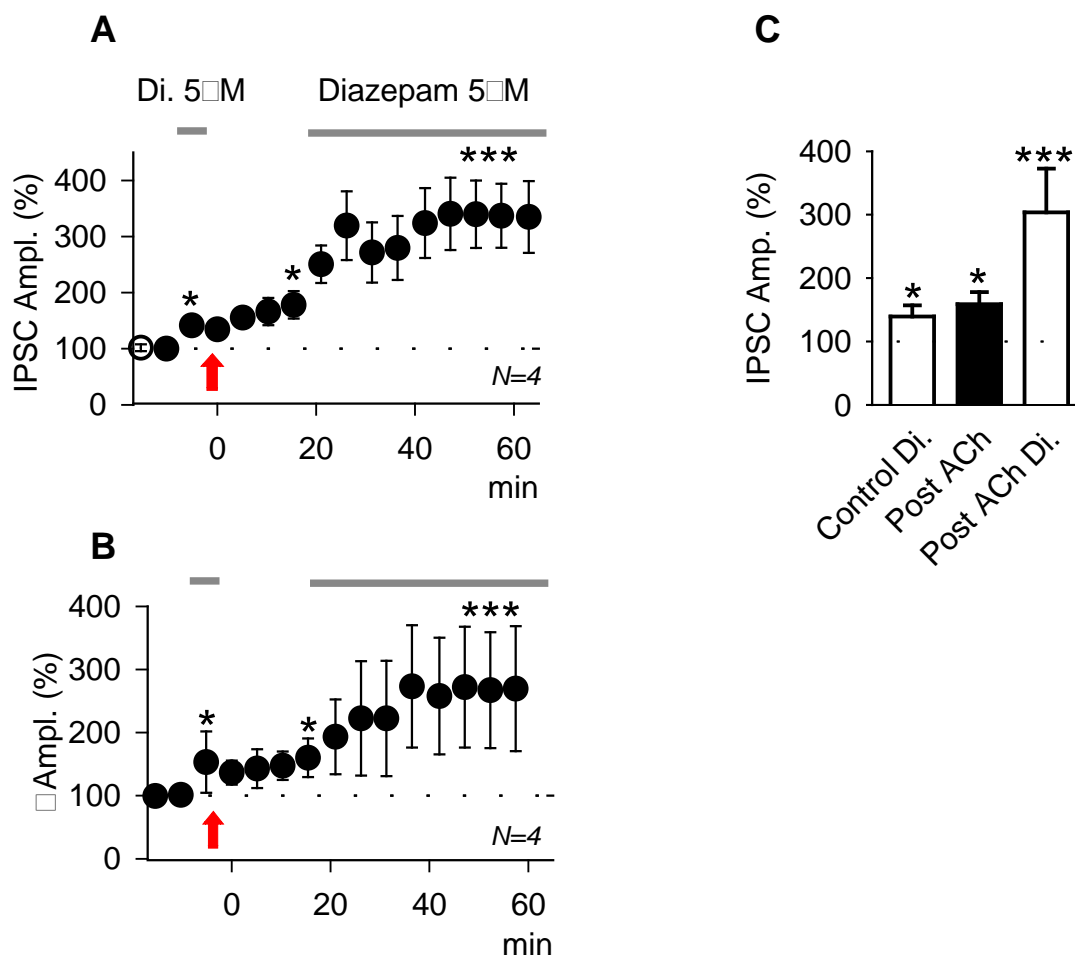
Para investigar la contribución a la GABA<sub>A</sub>-LTP del aumento del número de los GABA<sub>A</sub>Rs, se emplearon las benzodiazepinas (BZ) ya que existen receptores de cinética lenta con sensibilidad a BZ que aumenta la sensibilidad a GABA y el tiempo de apertura del canal (Belelli y col., 2009). Si el número de estos receptores aumenta gradualmente en la sinapsis durante la GABA<sub>A</sub>-LTP por difusión lateral desde sitios extrasinápticos, el efecto del diazepam sobre los IPSCs debe ser débil en situación control, cuando el número de receptores con cinética lenta tiene que ser bajo en la sinapsis. Por el contrario, el efecto del diazepam debe ser importante cuando la GABA<sub>A</sub>-LTP se ha estabilizado y la concentración de estos receptores con cinética lenta haya aumentado en la sinapsis.

Utilizando el protocolo de ACh y Despolarización y luego de registrar los IPSCs control, se analizan los efectos de la perfusión de diazepam (3  $\mu$ M) antes la aplicación



de ACh. Diazepam aumenta la amplitud de pico en  $141,68 \pm 17,40\%$  de los controles ( $p < 0,05$ ;  $N=4$ ) y la  $T$  de caída de los IPSCs en  $153,27 \pm 48,56\%$  de los controles ( $p < 0,05$ ; mismas células) (**Figura 26**). Después de lavar el diazepam, cuando los IPSCs vuelven a valores control, se aplica ACh y se induce la GABA<sub>A</sub>-LTP que se estabiliza en un valor potenciado de amplitud de pico de los IPSCs de  $178,14 \pm 24,46\%$  con respecto al control ( $p < 0,05$ ; mismas células) y una  $Tau$  de  $160,04 \pm 30,63\%$  con respecto al control ( $p < 0,05$ ; mismas células), se aplica diazepam nuevamente. En estas condiciones de potenciación diazepam induce un aumento mucho mayor de la amplitud de pico del IPSC de  $303,68 \pm 68,97\%$  con respecto al diazepam pre-ACh ( $p < 0,001$ ; mismas células) y un incremento mayor de la caída de la  $T$  ( $263,73 \pm 62,48\%$  con respecto al control pre-ACh ( $p < 0,001$ ; mismas células) (**Figura 26**), sugiriendo que el número de GABA<sub>A</sub>Rs extrasinápticos ha aumentado en las sinapsis en paralelo con la GABA<sub>A</sub>-LTP.

**Los resultados arriba descritos proporcionan un firme apoyo a la idea de que la GABA<sub>A</sub>-LTP es mediada principalmente por un aumento del número de GABA<sub>A</sub>Rs con cinética lenta en la sinapsis, posiblemente, a través de la difusión lateral desde sitios de extrasinápticos.**



**Figura 26:** Gráfica de la amplitud de pico (% del control) de los IPSCs en función del tiempo mostrando la GABA<sub>A</sub>-LTP inducida por la aplicación de ACh (flecha roja) y el efecto de la perfusión de diazepam (**barras grises**) que induce el aumento de a la amplitud de pico (**A**) y de la T de caída del IPSC (**B**). La gráfica de barras muestra los valores medios la amplitud de pico del IPSC (N=6) obtenidos en control con Diazepam y Post ACh sin y con Diazepam. Los asteriscos muestran la potenciación respecto al control sin diazepam tanto de los IPSCs como de las Taus. ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

### 1.12. ¿Es fisiológico este tipo de plasticidad mediada por la acción combinada de ACh y despolarización?

En condiciones de fijación de voltaje hemos demostrado que la combinación sinérgica de ACh y Despolarización induce un tipo de plasticidad al que hemos llamado GABA<sub>A</sub>-LTP. Es de vital importancia el establecer si en condiciones más cercanas a las

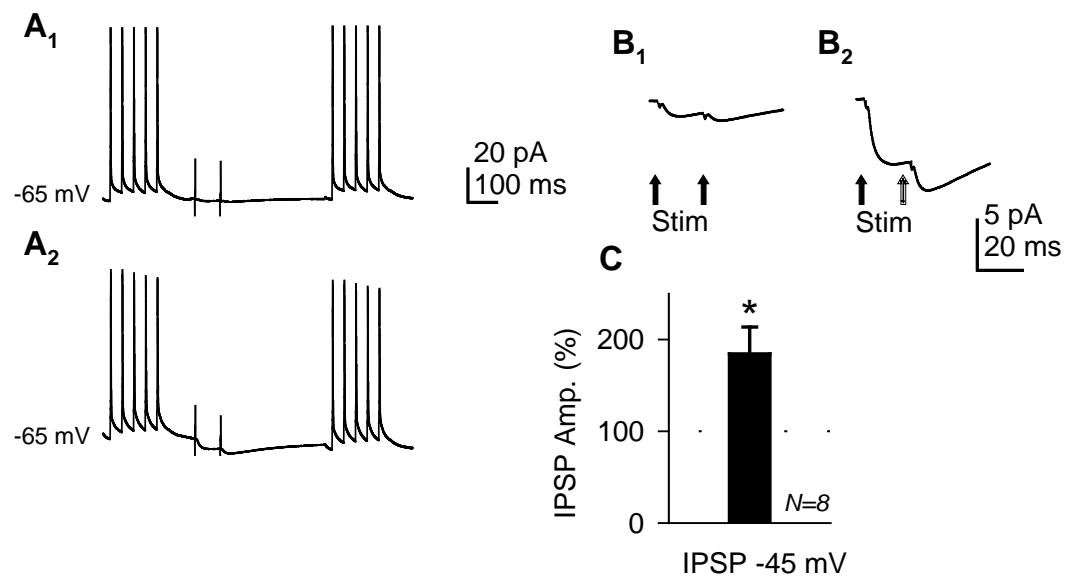
fisiológicas se puede inducir GABA<sub>A</sub>-LTP. Para establecer la posible viabilidad funcional del fenómeno vamos a realizamos experimentos en condiciones de fijación de corriente con objeto de caracterizar los cambios de voltaje en función de los cambios en la conductancia de la célula.

Para ello se emplea el protocolo llamado: ***Protocolo TBS en fijación de corriente*** (*Ver materiales y métodos, apartado 3.2.3.3*) que emula las condiciones del ritmo theta del hipocampo, generando ráfagas de APs a una frecuencia de 3-5 Hz y una duración de 100 ms cada ráfaga, generando así 4-5 APs, que van seguidos de un par de IPSPs evocados y separados entre sí por 50 ms.

La solución intracelular empleada para estos experimentos contiene 1mM de Cl<sup>-</sup> (*Ver materiales y métodos, apartado 3.2.1.3*) y la usamos en estas condiciones porque su  $E_{Cl^-}$  calculado es de -123,20 mV, lo que implica que los IPSPs por encima de este valor serán siempre hiperpolarizantes. Además, en el ***apartado 1.3 y 1.4 de resultados***, se ha demostrado que la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> no influye sobre la GABA<sub>A</sub>-LTP y el empleo de esta solución intracelular confirmaría este hecho.

En estas condiciones experimentales tomamos durante 10-15 minutos los controles y después aplicamos la ACh (igual que en VC). Comprobamos que, efectivamente la ACh tiene efecto porque tras su aplicación, se activan los M1-mAChRs y como consecuencia se produce un bloqueo transitorio de la conductancia al ión K<sup>+</sup> y por tanto la despolarización de la neurona y el disparo de APs.

Tras la aplicación de la ACh se produce un aumento gradual de la amplitud de IPSP que se estabiliza en un valor medio del  $184,39 \pm 29,26$  % con respecto al control ( $p < 0,05$ ;  $N=8$ ) (***Figura 27***).



**Figura 27:** (A) Registro mostrando las respuestas generadas por el TBS, seguido por un par de pulsos que evocan IPSPs en los controles (A1), y 30 min después de la aplicación de ACh (A2) (B1) Control IPSPs, promedio ( $n=30$ ) y (B2) potenciados 30 min después de ACh (C) el porcentaje de potenciación del IPSP con respecto al control, 100 %.

Estos resultados demuestran que la GABA<sub>A</sub>-LTP es un fenómeno que se observan en condiciones cercanas a las fisiológicas.

Los resultados arriba descritos demuestran que en células piramidales de CA1 del hipocampo de rata existe un tipo de plasticidad sináptica GABAérgica, a la que hemos llamado GABA<sub>A</sub>-LTP que es inducida en condiciones de ACh y despolarizaciones sucesivas semejantes al ritmo theta del hipocampo.

## 2. SUPRESIÓN DE LA DSI Y APARICIÓN DE UN NUEVO FENÓMENO, LA FID.

Como hemos visto, la acción combinada de ACh y Despolarización genera la GABA<sub>A</sub>-LTP. Además, la despolarización genera un aumento del calcio intracelular que induce la liberación del eCB en la célula postsináptica produciendo la supresión de la liberación de GABA por parte de un subtipo de interneurona GABAérgica conocida como CCK<sup>+</sup>. La supresión de la liberación de GABA disminuye la eficacia de estas sinapsis inhibitorias, fenómeno que se llama DSI del inglés, *depolarization suppression of inhibition* (Llano y col., 1991; Alger y col., 1996; Chevaleyre y col., 2006).

La estimulación en el SR puede activar los terminales de dos tipos de interneuronas inhibitorias las CCK<sup>+</sup> o las PV<sup>+</sup> que hacen sinapsis con las neuronas piramidales de CA1 y como ya vimos, las CCK<sup>+</sup> poseen receptores CB<sub>1</sub> mientras que las PV<sup>+</sup> carecen de ellos. (Katona y col., 1999; Freund, 2003).

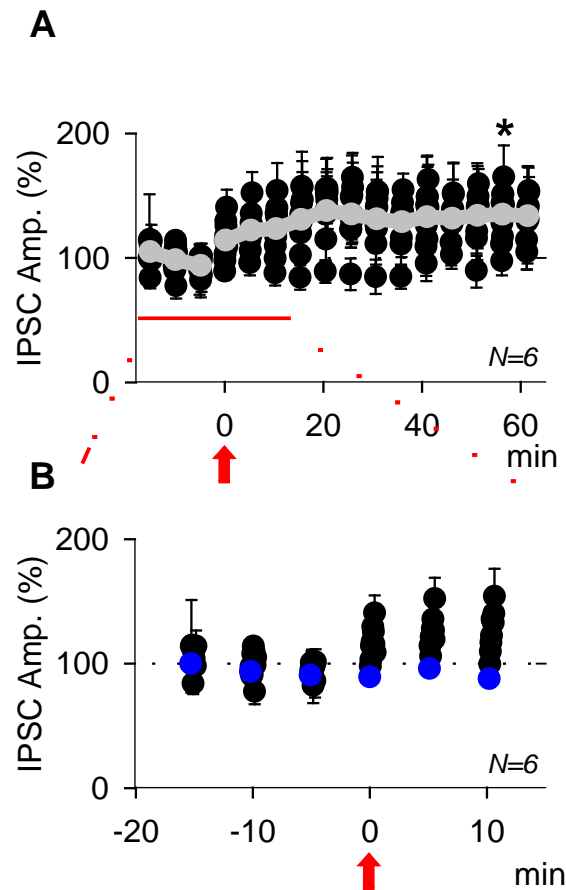
Para analizar la posible contribución de los mecanismos presinápticos en la GABA<sub>A</sub>-LTP estudiamos la DSI antes y después de la aplicación de la ACh, en las mismas células donde previamente habíamos analizamos la GABA<sub>A</sub>-LTP (**Figura 28**).

En nuestras condiciones experimentales estudiamos la DSI durante la despolarización a 0 mV (10 mM de Cl<sup>-</sup> en la solución intracelular) y observamos una reducción fuerte y gradual de la amplitud de los IPSCs, en la **Figura 29** se muestra la magnitud de la reducción promedio de los IPSCs que es del  $46.99 \pm 1.69\%$  respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $N=16$ ). Además, la reducción de los IPSCs se ajusta a una única función exponencial que posee una  $T$  de 7,6345s ( $N=16$ ) y una de  $R= 0,9782$  (**Figura 29**).

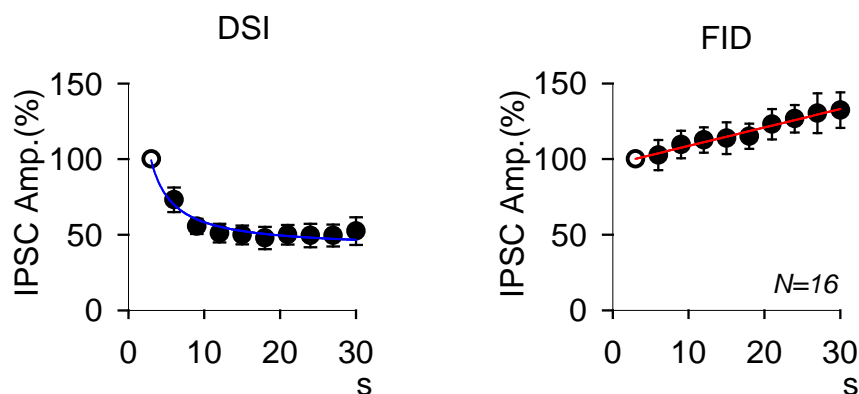
Inmediatamente después de la aplicación del pulso de ACh, se observa la aparición de un nuevo fenómeno, antes no descrito, que consiste en el aumento gradual de la amplitud de los IPSCs durante la despolarización. A este fenómeno lo hemos denominado **FID** (del inglés: *Facilitation of inhibition by depolarization*). Es importante destacar que la FID es un fenómeno operacionalmente opuesto a la DSI (**Figura 28B**). La FID no se ajusta a una función exponencial como la DSI sino que lo hace a una recta con una pendiente de 1,22 y una de  $R=0,9895$  (**Figura 29B**).

La FID, evocada por despolarizaciones sucesivas, se induce inmediatamente después de la activación de los M1-AChRs y se prolonga hasta que transcurren  $50,19 \pm 5,08$  minutos desde la aplicación de ACh (**Figura 28**). Finalmente se llega a un estado estacionario en el que el pico de la amplitud del IPSC se encuentra potenciado en  $294,12 \pm 39,72\%$  con respecto al control ( $p<0,001$ ;  $N=6$ ) (**Ver apartado 1.3; figura 13**).

Analizamos el desarrollo de la FID en el tiempo que sigue a la aplicación de ACh en las respuestas de las 16 células piramidales estudiadas. Durante los 30 segundos a 0 mV durante los que se genera la FID observamos que: (i) se genera en todas las células analizadas; (ii) persiste solamente en 5 de las 16 CPs registradas (31,25%); y (iii) la desaparece transitoriamente para volver a emerger a los  $6,87 \pm 2,16$  minutos después de la aplicación de la ACh en las otras 11 neuronas estudiadas (68,75%).



**Figura 28:** (A) Gráfica de la amplitud media de pico (% del control) de los IPSCs en función del tiempo mostrando la  $GABA_A$ -LTP inducida por la aplicación de ACh (flecha roja). Los registros superiores son ejemplos de IPSCs sucesivos superpuestos obtenidos de un experimento de los que se compone la grafica inferior. El registro azul corresponde al primer IPSC en el control (izquierda; donde ocurre DSI) y post ACh durante la  $GABA_A$ -LTP (derecha; donde ocurre FID) (B) Detalle obtenido de (A) (línea roja horizontal) donde cada punto corresponde al promedio de la amplitud de pico de IPSCs en función del tiempo durante las despolarizaciones antes y después de la aplicación de ACh (flecha roja). El círculo azul indica el primer IPSC; véase la DSI en los controles y la FID inéditamente después de ACh.



**Figura 29:** Gráficas de la amplitud media de pico de los IPSCs en función del tiempo mostrando la DSI en el control (*izquierda*) y la FID (*derecha*) obtenida durante la GABA<sub>A</sub>-LTP, ambas registradas durante la despolarización a 0 mV. Las líneas continuas superpuestas corresponde a los ajustes polinomio y lineal correspondientes. En ambos casos 100% corresponde a la amplitud de pico del primer IPSC.

## 2.1. Efectos del bloqueo de los receptores CB<sub>1</sub>.

Hay que destacar que el trabajo se centra en los experimentos que presentan una clara DSI durante las despolarizaciones control a 0 mV y la DSI depende de la activación de receptores CB<sub>1</sub> así que queremos estudiar también, la implicación de los receptores CB<sub>1</sub> en tipo de plasticidad sináptica, para lo cual bloqueamos el receptor CB<sub>1</sub> con su agonista inverso, el AM-251.

Usamos el protocolo ACh y Despolarización, la solución intracelular de 10 mM de Cl<sup>-</sup> e incubamos la rodaja con AM-251 (2  $\mu$ M) en el baño. En situación control observamos la abolición de la DSI, luego el AM-251 está realmente bloqueando al CB<sub>1</sub>R y funciona (**Figura 30 y 31**).

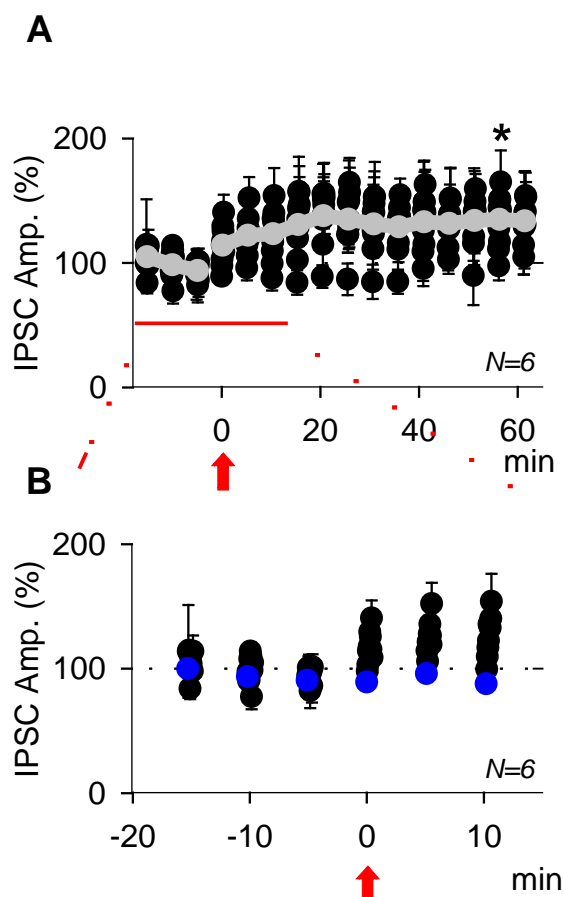
Después de la aplicación de ACh, se observa que la FID no se afecta por el agonista inverso, ya que, al igual que ocurre cuando no se incubaba en presencia de AM-251, los promedios de los picos de la amplitud de los IPSCs se ajustan a una recta cuya pendiente en este caso es de 2,07 con una  $R=0,9443$  (**Figura 30**). Además, incubando



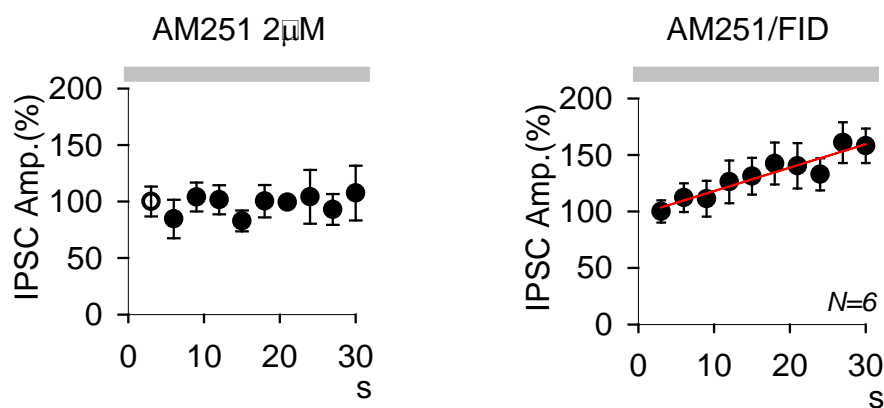
con AM-251, al cabo de unos  $\approx 30$  min se observa una potenciación de la amplitud del IPSC de  $151,98 \pm 14,71\%$  con respecto al control; ( $p < 0,05$ ,  $N=6$ ) (**Figura 30**) aunque dicha potenciación es significativamente menor que la obtenida sin la presencia del agonista inverso ( $p < 0,05$ ;  $N=12$ ). Luego la FID no depende de la activación de los receptores CB<sub>1</sub>. Es importante destacar que la desaparición de la DSI y la aparición de la FID provocan *per se* un rápido aumento de la amplitud media de pico del IPSC.

**Por lo tanto, si bloqueamos los receptores CB<sub>1</sub>, se ven afectadas la DSI y la potenciación del IPSC, pero en ningún caso la FID (Figura 30 y 31) y además, la abolición de la DSI genera una potenciación *per se*.**

Los resultados arriba descritos demuestran que los receptores CB<sub>1</sub> están implicados en la generación de la DSI, un fenómeno presináptico (Alger y col., 1996; Chevaleyre y col., 2006, 2007): Sin embargo otros autores han demostrado la implicación de los CB<sub>1</sub>Rs a nivel postsináptico, como es el caso de la regulación autocrina de neuronas neocorticales que inducen una autoinhibición de larga duración mediada por eCBs. (Bacci y col., 2004). Por lo tanto sabemos que los receptores CB<sub>1</sub> producen una disminución de la potenciación GABAérgica, pero desconocemos el sitio de generación de la FID, aunque el hecho de que no se vea afectada por AM-251 en principio excluye una participación presináptica en la FID.



**Figura 30:** (A) Gráfica de la amplitud media de pico (% del control) de los IPSCs en función del tiempo y en presencia de **AM-251** (2 $\mu$ M) mostrando una reducción de la GABA<sub>A</sub>-LTP (pero no su total desaparición) inducida por la aplicación de ACh (flecha roja). Los **círculos grises** corresponden a los promedios de todas las respuestas promedio cada cinco minutos y los **círculos negros** muestran los promedios cada cinco minutos de cada una de las repuestas (desde la primera a la décima durante las despolarizaciones a 0 mV) (B) Detalle (obtenido de (A) línea roja horizontal) de los promedios cada cinco minutos de las 10 repuestas que tiene lugar a 0 mV antes y después de ACh (flecha roja); los círculos azules corresponden a la primera respuesta durante las despolarizaciones. **AM-251 inhibe la DSI pero no afecta la FID**; véase la abolición de la DSI en control pero no de la FID inéditamente después de ACh.



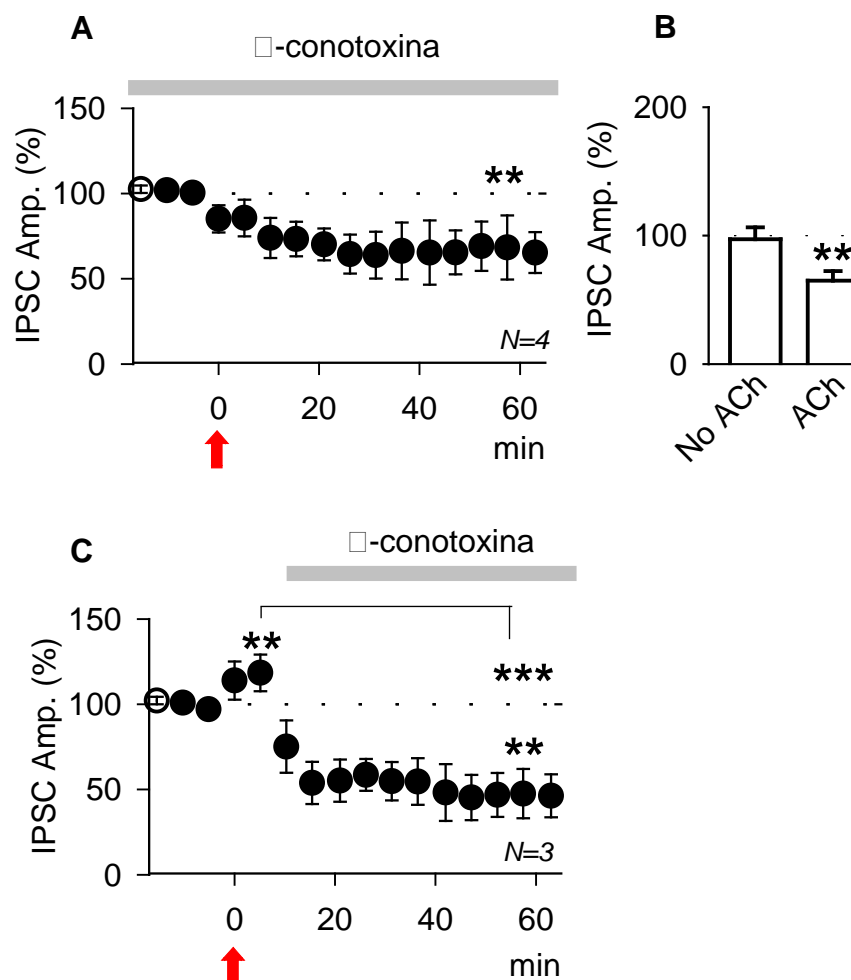
**Figura 31:** Gráficas de la amplitud media de pico de los IPSCs en función del tiempo en presencia de AM251 ( $2\mu\text{M}$ ) y ambas registradas durante la despolarización a 0 mV. En condiciones control (*izquierda*) no ha DSI y post ACh (*derecha*) aparece la FID., La línea continuas superpuesta en la gráfica de la derecha corresponde al ajuste lineal. En ambos casos 100% corresponde a la amplitud de pico del primer IPSC.

## 2.2. Las interneuronas $\text{CCK}^+$ median en este fenómeno plástico generado por ACh y Despolarización.

Como se ha descrito anteriormente, en el SR hay dos tipos de interneuronas asociadas a las SCs, las  $\text{CCK}^+$  y las  $\text{PV}^+$ . Las  $\text{CCK}^+$  poseen  $\text{CB}_1\text{Rs}$ , no así las  $\text{PV}^+$  pero al estimular eléctricamente el SR cerca de la capa de piramidal se pueden activar ambos tipos. Para determinar qué tipo de receptor está involucrado en la  $\text{GABA}_\text{A}$ -LTP y el cambio DSI/FID bloqueamos selectivamente las  $\text{CCK}^+$ . Para ello inhibimos específicamente la liberación de GABA de las interneuronas  $\text{CCK}^+$  con  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -gTX) que bloquea selectivamente los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes tipo N presentes estas interneuronas, pero no en las  $\text{PV}^+$ . (Hefft y Jonas, 2005; Karson y col., 2009).

Utilizando el protocolo de ACh y Despolarización y la solución intracelular de 10 mM de  $\text{Cl}^-$  inicialmente incubamos la rodaja con  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $0.5\ \mu\text{M}$ ) lo que inhibe el cambio DSI/FID y la posterior potenciación del IPSC, produciéndose una

reducción del IPSC de  $64,87 \pm 7,46\%$  con respecto al control ( $p < 0,01$ ;  $N=4$ ) (**Figura 32A**).



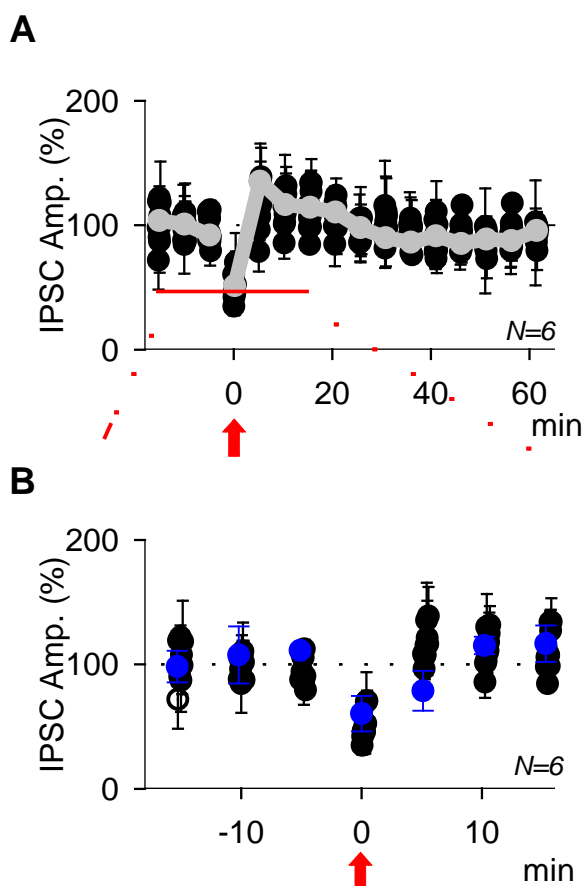
**Figura 32:**(A) Protocolo de ACh y despolarizaciones sucesivas en presencia de  $\omega$ -conotoxina perfundida durante todo el registro); indicado con la línea gris en la gráfica. ACh se produce una LTD ( $p < 0,01$ ;  $N=4$ ). En (B) se muestra mediante barras la amplitud del IPSC (% del control) con  $\omega$ -conotoxina en el baño pero sin aplicar ACh (No ACh) y con la toxina cuando se aplica la ACh (ACh). Cuando no se aplica la ACh no hay diferencias significativas con los controles, mientras que cuando sí se aplica la ACh hay diferencias significativas ( $p < 0,01$ ;  $N=4$ ) con respecto a la situación control (C) Como en (A) pero la  $\omega$ -conotoxina se aplica después de ACh cuando el IPSC se halla potenciado ( $p < 0,05$ ); indicado con la línea gris en la gráfica. La toxina inhibe los IPSCs por debajo de los valores control y abole la potenciación de los IPSCs.

En otro grupo de experimentos, se induce la GABA<sub>A</sub>-LTP, mediante el protocolo de ACh y Despolarización y la solución intracelular de 10 mM de Cl<sup>-</sup>, pero una vez que se estabiliza la GABA<sub>A</sub>-LTP en valores de  $120,43 \pm 1,42\%$  de los controles, ( $p < 0,01$ ;  $N=3$ ). Se aplica en perfusión  $\omega$ -conotoxina GVIA (0.5  $\mu$ M) que induce una marcada y rápida reducción de la amplitud del IPSC de  $47,64 \pm 3,61\%$  con respecto al control ( $p < 0,01$ ) y del  $39,55 \pm 2,54\%$  con respecto a la potenciación; ( $p < 0,001$ ; mismas células).

### **2.3. Los efectos de ACh y Despolarización sobre la DSI y la FID requieren un aumento de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>.**

Se sabe que el calcio intracelular es importante en diversos fenómenos plásticos (Revisado en Zucker, 1999) y puede modificar las propiedades biofísicas de los receptores GABA<sub>A</sub> (Ormond y Woodin, 2011), siendo imprescindible para la generación de la GABA<sub>A</sub>-LTP. Además tanto la liberación de ACh como la despolarización tienen como consecuencia el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular por activación de los M1-mAChRs y de los VGCCs, respectivamente. Por ello queremos estudiar cómo afecta el aumento de calcio a la generación de la FID.

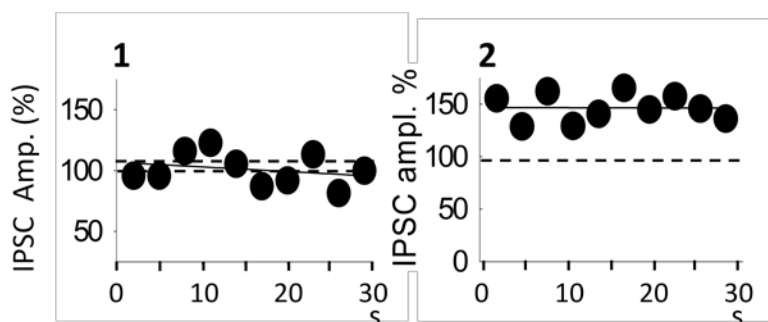
Para ello aplicamos el protocolo de ACh y Despolarización con la solución intracelular de 10 mM de Cl<sup>-</sup> y bloqueamos la entrada de calcio a la célula a través de los VGCC tipo L incubando la rodaja con nimodipina (10  $\mu$ M). En estas condiciones observamos la abolición de la DSI en el control, la inhibición de la GABA<sub>A</sub>-LTP ( $107,57 \pm 4,01\%$  de los controles;  $p > 0,05$ ;  $N=6$ ) y la abolición parcial de la FID, que tras la aplicación de ACh emerge rápidamente para desaparecer definitivamente en la siguiente respuesta (*Figura 33*).



**Figura 33:** Gráficas de la amplitud media de pico de los IPSCs en función del tiempo en presencia de Nimodipina (A) Los círculos grises corresponden a los promedios de todas las respuestas promedio cada cinco minutos y los círculos negros muestran los promedios cada cinco minutos de cada una de las repuestas (desde la primera a la décima durante las despolarizaciones a 0 mV) (B) Detalle (obtenido de (A) línea roja horizontal) de los promedios cada cinco minutos de las 10 respuestas que tiene lugar a 0 mV antes y después de ACh (flecha roja); los círculos azules corresponden a la primera respuesta durante las despolarizaciones. Nimodipina inhibe la DSI y la FID excepto para primera respuesta tras la aplicación de ACh.

Como la Nimodipina no abole la FID en la primera respuesta que tiene lugar inmediatamente de la aplicación de ACh, pensamos que para la inducción de dicha FID era posible que la célula emplease su calcio intracelular y por ello quelamos el calcio intracelular con BAPTA (20 mM). El BAPTA indujo la abolición de la DSI en los

controles (*Figura 34*). Luego concluimos que **la DSI, la potenciación y la FID requieren de un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  para producirse.**



**Figura 34:** Gráficas de la amplitud media de pico de los IPSCs en función del tiempo con **BAPTA intracelular** durante despolarizaciones a 0 mV en condiciones control (**1**) en la que no hay DSI y post ACh (**2**) en la que no hay FID (en **1** y **2** 100% corresponde a la primera respuesta control).

En resumen, si bloqueamos los  $\text{CB}_1\text{R}$  o quelamos el calcio intracelular se abole la DSI y se produce una marcada reducción de la potenciación sináptica aunque no su total desaparición. Sin embargo en condiciones en las que se bloquea el receptor  $\text{CB}_1$  la FID permanece intacta produciendo una instantánea potenciación. Por el contrario cuando quelamos el calcio intracelular con BAPTA nos encontramos con la total abolición de la FID.

Vemos una vez más que el calcio, que resulta de gran importancia para la generación de estos dos tipos de fenómenos plásticos la  $\text{GABA}_\text{A}$ -LTP y la FID. En cambio, aunque los eCBs también están interviniendo en toda esta fenomenología, no son necesarios para la generación de la FID y no sabemos a qué nivel están actuando si a nivel pre o postsináptico, pese a que hay indicios que indican que es a nivel presináptico.

### 3. DISTINCIÓN ENTRE EL COMPONENTE PRESINÁPTICO y EL POSTSINÁPTICO.

Los resultados anteriores sugieren que en este fenómeno plástico hay implicados mecanismos tanto pre- como post-sinápticos que contribuyen a la potenciación de la amplitud de pico del IPSC. La liberación de eCB de la neurona piramidal inducida por el aumento de calcio intracelular debida a la despolarización y la subsiguiente activación de CB<sub>1</sub>R se postula como el mecanismo presináptico que modula la liberación de NT por parte del terminal.

Sin embargo, al realizar el análisis de la PPR (del inglés *paired-pulse ratio*) no hay diferencias significativas entre los controles y post-ACh ( $p > 0,05$ ;  $N=6$ ).

Probamos a aplicar pulso de GABA repetidos en el tiempo conjuntamente con el protocolo de despolarizaciones sucesivas con una frecuencia parecida a la usada durante la estimulación eléctrica, la intención es aislar así, el componente postsináptico y poder discernir qué ocurre pre y post- sinápticamente.

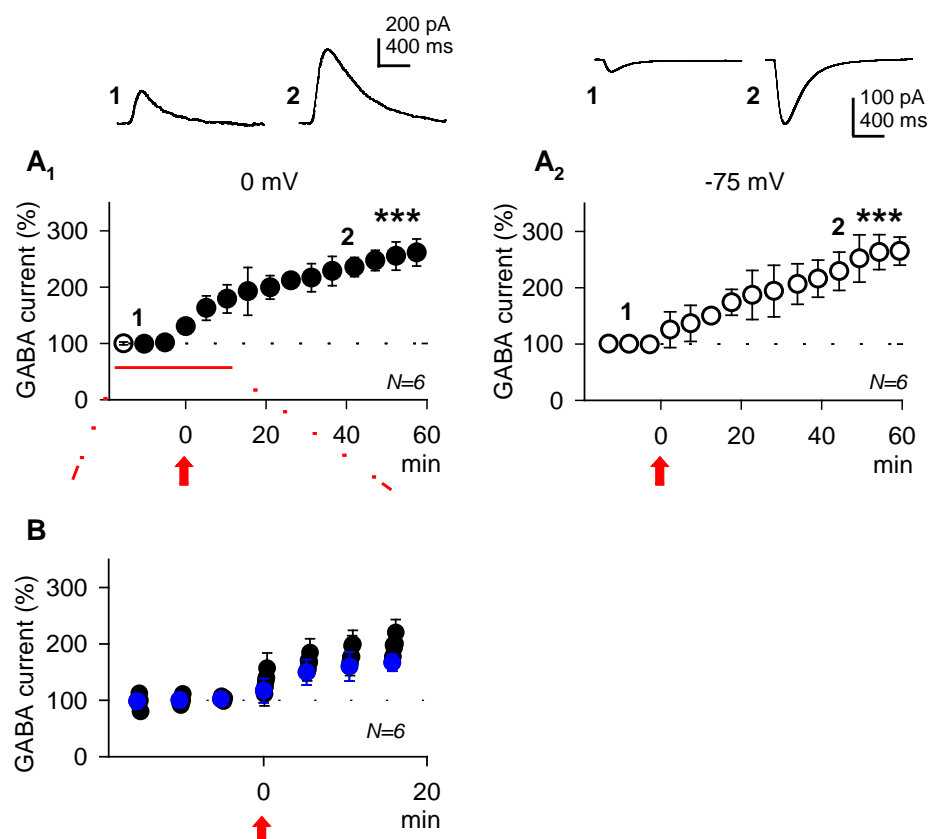
#### 3.1. La aplicación de GABA actúa directamente sobre los receptores GABA<sub>A</sub> aislando los componentes postsinápticos de la potenciación.

Para aislar los efectos postsinápticos de los presinápticos aplicamos pulsos de GABA (0,5 mM) sucesivos (cada 100-300 ms a una presión de 1.0-2.0 psi) cerca del soma de la neurona de registro (~50  $\mu$ m). De esta manera activamos directamente los GABA<sub>A</sub>Rs postsinápticos sin que intervengan los mecanismos presinápticos, aislando así, el componente postsináptico. Los pulsos de GABA generan una corriente (corriente GABA) que en situación control y con la solución intracelular de 10 mM de Cl<sup>-</sup>, a 0 mV es una corriente de salida y posee una amplitud media de  $233,96 \pm 34,22$  pA y a -75 mV, es una corriente de entrada cuya amplitud media es de  $-55,34 \pm 9,78$  pA (**Figura**



35A). Bajo estas condiciones experimentales no se observa la DSI durante las despolarizaciones y los valores se mantienen estables durante los controles, lo que apoya la idea de que la DSI es un fenómeno presináptico, poniendo de manifiesto que este abordaje experimental consigue aislar el componente postsináptico.

Tras la aplicación del pulso de ACh se observa un marcado incremento de las corrientes GABA del  $247,38 \pm 25,92\%$  con respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $N=6$ ) para 0 mV y del  $263,84 \pm 13,76\%$  a -75 mV ( $p < 0,001$ ; mismas células) (Figura 35B). Además de la potenciación de la corriente GABA, inmediatamente después de la aplicación de ACh se genera un aumento regular de las corrientes durante las despolarizaciones indicando la presencia de FID (Figura 35C), indicando que la FID es un fenómeno postsináptico.

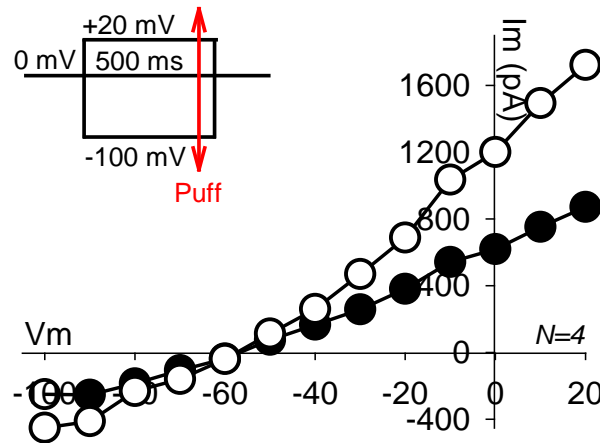


**Figura 35:** Gráficas de la amplitud media de las corrientes GABA en función del tiempo registradas 0 mV (círculos negros) y -75 mV (círculos blancos). En (A) cada círculo representa los valores promedio de las corrientes GABA cada 5 minutos (al igual que en el caso de los IPSCs), la flecha roja indica la aplicación de la ACh. Podemos observar la potenciación generada por la aplicación de ACh a ambos potenciales ( $p < 0,001$ ;  $N=6$ ). Los registros superiores muestran ejemplos de la corriente GABA control (1) y post ACh (2) a 0 mV ( $A_1$ ) y a -75 mV ( $A_2$ ). En (B) se muestra la ausencia de DSI y la presencia de FID; los círculos azules corresponden a la primera respuesta durante las despolarizaciones

### 3.1.1. Durante la potenciación de la corriente GABA aparece una voltaje dependencia.

Como el análisis de los efectos de los pulsos de GABA permite aislar el componente postsináptico, sería importante determinar si la voltaje dependencia inducida por ACh y Despolarización detectada en los IPSCs está también presente en las corrientes GABA. Esto permitiría establecer si los cambios en las relaciones I/V que acompañan a la GABA<sub>A</sub>-LTP tienen un origen pre- o postsináptico.

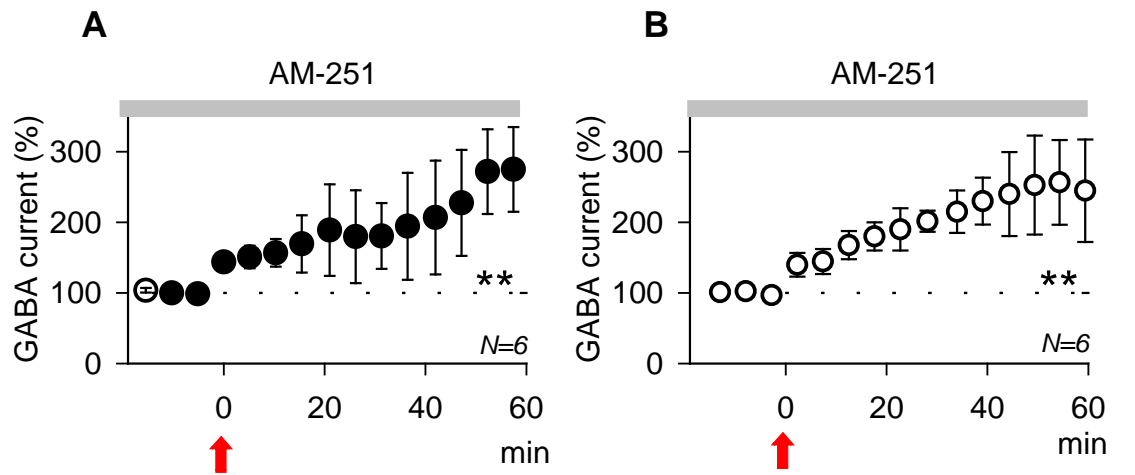
La relación I/V control usando el protocolo que parte de 0 mV es lineal. Por el contrario tras el pulso de ACh se produce un marcado aumento de la pendiente media de la relación I/V acompañada de una marcada rectificación de salida (a partir de -20 mV). Estos resultados son esencialmente idénticos a los de los IPSCs, lo que sugiere que en ambos casos los efectos de ACh sobre la voltaje dependencia son generados por mecanismos análogos de origen postsináptico (**Figura 36**).



**Figura 36:** Relación I/V para las corrientes GABA partiendo de 0 mV antes (**círculos negros**) y después de la aplicación de ACh (**círculos blancos**). A la izquierda se muestra un esquema del protocolo I/V usado (Ver figura 21). Usando el protocolo de despolarizaciones sucesivas ACh induce un aumento de la pendiente y una rectificación de salida.

### 3.2. La corriente GABA no se modifica en presencia de AM-251.

Si los efectos de ACh y Despolarización sobre las corrientes GABA son postsinápticos es de esperar que la liberación de eCBs y la activación de receptores CB<sub>1</sub> no estén implicadas en el fenómeno. Para comprobar si existe alguna contribución de los eCBs a dicho fenómeno, se incuban las rodajas de hipocampo con AM-251 (2  $\mu$ M) y se registran las corrientes GABA tanto a -75 mV como a 0 mV con el protocolo de ACh y Despolarización. En estas condiciones de bloqueo de los receptores CB<sub>1</sub> no se modifica la potenciación de la corriente GABA inducida por el protocolo ACh y Despolarización, que adquieren valores de  $273,40 \pm 21,30\%$  con respecto al control para 0 mV, ( $p < 0,01$ ;  $N=6$ ) y de  $250,62 \pm 13,39\%$  con respecto al control para -75 mV, ( $p < 0,01$  (mismas células) (**Figura 37**). **Por lo tanto podemos concluir que los cambios en la dependencia de voltaje de los IPSCs y las corrientes GABA no son mediados por activación de receptores CB<sub>1</sub>.**

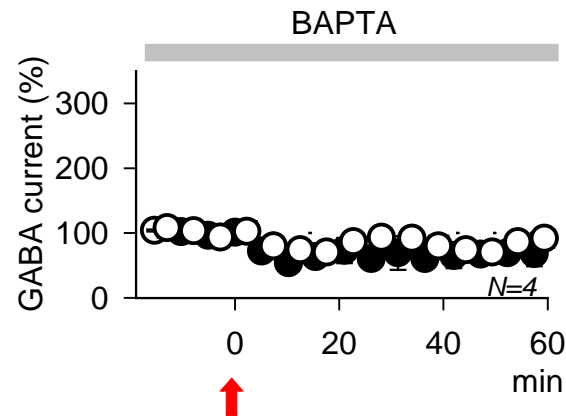


**Figura 37:** Gráficas de la amplitud media de las corrientes GABA en función del tiempo en presencia de AM 251 (2  $\mu$ M) a 0 mV (A) y la corriente GABA a -75 mV (B). En ambos casos se observa que la corriente GABA se potencia ( $p < 0.01$  (\*\*); N=6).

### 3.3. La corriente GABA es bloqueada por BAPTA intracelular.

El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular post-ACh resulta fundamental para la generación de la  $\text{GABA}_A$ -LTP, ya que induce una voltaje dependencia del  $\text{GABA}_A$ R y es imprescindible para la inducción de la FID. Por lo tanto, la demostración de una contribución postsináptica en la generación de estos cambios, apoyaría la idea de una importante participación postsináptica en la  $\text{GABA}_A$ -LTP. Por lo tanto, estudiaremos el efecto de BAPTA intracelular (20 mM) sobre la potenciación de las corrientes GABA inducidas por el protocolo ACh y Despolarizaciones sucesivas.

La ACh en presencia de BAPTA intracelular bloquea la potenciación de las corrientes GABA (***Figura 38***) y la FID (Datos no mostrados), lo que confirma que **los efectos del protocolo ACh y Despolarización son causados por un aumento en la concentración intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico.**



**Figura 38:** Gráficas de la amplitud media de las corrientes GABA en función del tiempo en presencia de **BAPTA intracelular** (20 mM) registradas a 0 mV (círculos negros) y a -75 mV (círculos blancos). En ambos casos se observa que el BAPTA intracelular abole la GABA<sub>A</sub>-LTP.

Gracias a este abordaje experimental, que aísla el mecanismo postsináptico, hemos determinado que los receptores CB<sub>1</sub> actúan a nivel presináptico y el aumento de Ca<sup>2+</sup> lo hace a nivel postsináptico.

## **V. DISCUSIÓN**

Las modificaciones a largo plazo de la inhibición sináptica son esenciales para garantizar el equilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal. Tradicionalmente se ha estudiado la modulación de la plasticidad neuronal excitadora, conociéndose menos sobre la plasticidad en las sinapsis inhibitorias. Sin embargo la plasticidad de la inhibición es de gran importancia pues la inhibición regula la excitabilidad neuronal y es un requisito fundamental en la función sensitiva, cognitiva y motora de los seres vivos.

En este trabajo se describe una nueva forma de plasticidad sináptica a largo plazo que tiene lugar en las sinapsis inhibitorias de las células piramidales de CA1 con las interneuronas GABAérgicas de *Stratum Radiatum* en el hipocampo de la rata. A este nuevo tipo de plasticidad sináptica inhibitoria a largo plazo que es inducida por la acción combinada de ACh y Despolarización y que no es *hebbiana*, ya que no requiere activación de los NMDARs, la hemos llamado GABA<sub>A</sub>-LTP.

### **1. Los efectos de la activación de receptores colinérgicos sobre la eficacia de las sinapsis GABA<sub>A</sub> dependen de la actividad postsináptica.**

La ACh está implicada en procesos de aprendizaje y memoria a nivel celular y de comportamiento (Aigner, 1995; Ovsepian y col., 2004; Fernández de Sevilla y col., 2008; Fernández de Sevilla y Buño, 2010). Las lesiones en las proyecciones colinérgicas del circuito que conectan el *septum* con el hipocampo producen déficits cognitivos. Las aferencias del *septum* sobre el hipocampo liberan ACh que genera el ritmo  $\theta$  del hipocampo (Dudar, 1977), ritmo que también se ha relacionado con el aprendizaje y la memoria (Huerta y Lisman, 1995; Hoffman y col., 2002).

Es importante destacar que en ausencia de activación postsináptica, la ACh genera i-LTD y no GABA<sub>A</sub>-LTP, indicando que el estado de activación o silencio de la

célula postsináptica actúa como una compuerta que establece el signo del cambio en la eficacia de transmisión sináptica inhibitoria inducido por ACh. Esta nueva forma de plasticidad estado-dependiente, en la que ACh induce la i-LTD si la célula se encuentra en reposo y por el contrario, GABA<sub>A</sub>-LTP, si la célula esta activa, podría tener importancia regulando el balance excitación/inhibición necesario para el funcionamiento de los circuitos del hipocampo y actuar como retroalimentación negativa homeostática para el control de excitaciones anormalmente desproporcionadas.

En condiciones control, cuando la neurona piramidal está en reposo (sin despolarizaciones) ACh induce la activación de los M1-mAChRs, provocando liberación prolongada de eCBs de la neurona piramidal y la activación de receptores CB<sub>1</sub> en las terminales de las interneuronas CCK<sup>+</sup>, lo que induce una disminución de la probabilidad de liberación de GABA. El efecto prolongado de la activación de receptores CB<sub>1</sub> modifica los mecanismos de liberación en las terminales de las interneuronas CCK<sup>+</sup>, provocando finalmente la i-LTD (Wilson y Nicoll, 2002; Chevalyeyre y col., 2006; Lovinger, 2008; Kano y col., 2009; Castillo y col., 2011).

Por el contrario, cuando la neurona piramidal está sujeta a despolarizaciones sucesivas en condiciones control (pre-ACh) el aumento de calcio intracelular, causado por la activación de los VGCCs de tipo L, induce la liberación de eCBs de la neurona piramidal y la activación de los receptores CB<sub>1</sub> en las terminales de las interneuronas CCK<sup>+</sup>. La activación de los receptores CB<sub>1</sub> provoca la DSI, que es el resultado de una disminución de la probabilidad de liberación de GABA durante las despolarizaciones. En estas condiciones, la aplicación de ACh induce la supresión de la DSI por mecanismos que aún desconocemos.



La ACh también modula la plasticidad sináptica excitadora glutamatérgica en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo de rata. Fernández de Sevilla y col., 2008, estudiaron un tipo de LTP no *hebbiana* a la que denominan LTP<sub>IP3</sub> en la que ACh induce incremento de la concentración intracelular de calcio lo que resulta en el aumento de la expresión en la superficie de membrana de receptores AMPA con las subunidades GluR1 y GluR2, en las espinas dendríticas de células piramidales de CA1 por la inserción mediante exocitosis. En este sistema, ACh modifica paralelamente las propiedades biofísicas de los receptores NMDA preexistentes en dichas espinas. Es interesante, además, que estos efectos puedan ser inducidos por la estimulación tetánica del alveus (Fernández de Sevilla y Buño, 2010), lo que sugiere que mecanismos similares pueden estar presentes en condiciones fisiológicas. Los procesos por los que la ACh desencadena la LTP<sub>IP3</sub> son comparables a los que inducen la GABA<sub>A</sub>-LTP como: (i) la activación de los M1-mAChRs; (ii) el aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular mediado por liberación de IP<sub>3</sub>; y (iii) la señalización intracelular a través de CamKII. Sin embargo, también difieren en otros aspectos, debido a que para la generación de LTP<sub>IP3</sub> se producen cambios de la propiedades de los receptores de NMDA y es necesaria la activación de proteínas SRC y PKC, pero no es necesaria la contribución de PKA, que si lo es en el caso de la GABA<sub>A</sub>-LTP, ni la despolarización postsináptica (Fernández de Sevilla y Buño, 2010), que es clave en la generación de la GABA<sub>A</sub>-LTP.

Este tipo de fenómeno estado-dependiente también se ha visto en el núcleo coclear dorsal, pero en este caso hay una LTP *hebbiana* postsináptica y una LTD anti-*hebbiana* presináptica. La activación postsináptica de M1-M3-mAChRs, que produce la liberación de eCBs, convierte la LTP postsináptica, previamente inducida por activación de NMDARs y el influjo de Ca<sup>2+</sup> en LTD presináptica generada por la liberación de eCBs. (Zhao y Tzounopoulos, 2011). En este caso la compuerta también sería el

aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pero a diferencia de la  $\text{GABA}_A$ -LTP, aquí es necesario que se activen los NMDARs.

Otro caso de comparable de compuerta en el sistema nervioso es el de la transmisión sináptica mixta (eléctrica y química) en la célula de Mauthner del pez “*Goldfish*”, donde un aumento de la liberación dendrítica de eCBs por parte de dichas células potencia la transmisión sináptica de las sinapsis mixtas eléctricas y químicas (NT: glutamato) gracias a un aumento de la liberación de dopamina por parte de las varicosidades nerviosas. (Cachope y col., 2007), o el caso de la LTD heterosináptica  $\text{GABA}_A$ érgica hipocampal inducida por la unión del glutamato a su receptor muscarínico tipo 1, lo que activa PLC que producen la liberación de eCB, el cual se une a su receptor  $\text{CB}_1\text{R}$  en el terminal presináptico  $\text{GABA}_A$ érgico, produciéndose así una LTD heterosináptica  $\text{GABA}_A$ érgica (Chevaleyre y Castillo, 2003).

## **2. El aumento de la concentración de calcio intracelular modifica el número y las propiedades de los recetores $\text{GABA}_A$ sinápticos.**

Dado que GABA satura los receptores  $\text{GABA}_A$  la  $\text{GABA}_A$ -LTP debe acompañarse de un aumento gradual en el número de receptores en la sinapsis. Sin embargo las propiedades biofísicas del tipo de receptor  $\text{GABA}_A$  que incrementa en la sinapsis puede ser determinante en la génesis de la  $\text{GABA}_A$ -LTP.

Una característica relevante de la  $\text{GABA}_A$ -LTP, es el aumento de la  $T$  del IPSC después de la aplicación de ACh. Este aumento de la  $T$  puede ser causado por diversos motivos: (i) inserción de receptores  $\alpha_5\beta\gamma_2$  en la sinapsis transportados por endosomas; (ii) la inserción en la sinapsis de receptores  $\alpha_5\beta\gamma_2$  extrasinápticos caracterizados por una cinética lenta (Banks y Pearce, 2000; Farrant y Nusser, 2005; Kullmann y col., 2005; Belelli y col., 2009; Luscher y col., 2011), (iii) modificaciones de las propiedades

biofísicas y/o a la sensibilidad a GABA de los receptores GABA<sub>A</sub> preexistentes en la sinápsis (Ormond y Woodin, 2011).y (iv) una disminución en la tasa de internalización de los GABA<sub>A</sub>Rs (Wang y col., 1999; Leil y col., 2004; Esta acción sinérgica de ACh y despolarización no produce la inserción de *novο* de receptores GABA<sub>A</sub> procedentes del interior celular aunque no puede descartarse que esté disminuyendo también, la tasa de internalización de los GABA<sub>A</sub>Rs.

Los resultados indican que los receptores que aumentan en la sinapsis tienen sensibilidad a benzodiazepinas, respuestas de cinética lenta (Banks y Pearce, 2000; Farrant y Nusser, 2005; Kullmann y col., 2005; Belelli y col., 2009; Luscher y col., 2011), mayor sensibilidad a GABA (Ormond y Woodin, 2011) y la voltaje-dependencia que caracteriza a los receptores que en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo son del tipo  $\alpha_5\beta\gamma_2$  (Brickley y Mody, 2012). Estos receptores se encuentran tanto en la sinapsis como en las regiones extrasinápticas, pero su densidad relativa en relación a los de cinética rápida es mucho mayor en las regiones extrasinápticas.

### **3. Efecto de la activación de los receptores eCBs sobre la plasticidad y la efectividad sináptica de la transmisión GABAérgica monosináptica.**

Como hemos discutido anteriormente la liberación de eCBs contribuye activamente en la inducción de la GABA<sub>A</sub>-LTP ya que la supresión de la DSI y su sustitución por la FID resultan en un incremento instantáneo de la amplitud de los IPSCs. Este salto de amplitud de los IPSCs es debida al aumento de la probabilidad de liberación de GABA y a la acentuación de la sensibilidad a GABA y voltaje causados por incremento en el número de receptores del tipo  $\alpha_5\beta\gamma_2$  en la sinapsis.

Es importante destacar que los resultados indican que la DSI es un fenómeno puramente presináptico y por el contrario la FID y la subsiguiente potenciación de los

IPSCs es un fenómeno de origen postsináptico. Por lo tanto ACh induce un desplazamiento instantáneo pre-postsináptico del sitio en el que se genera la regulación de la efectividad las sinapsis GABA<sub>A</sub>. Esta traslación de la regulación está acoplada a modificaciones en los mecanismos moleculares que controlan la eficacia sináptica GABA<sub>A</sub>.

Aunque la DSI es un fenómeno puramente presináptico no observamos cambios significativos en la PPR que podrían indicarnos cambios en la probabilidad de liberación asociados a la DSI y su supresión por ACh. Hay otros autores como (Kim y Alger, 2001) que tampoco observan cambios estadísticamente significativos cuando estudian la PPR en la respuesta inhibitoria inducida por la DSI. Por otro lado, hay autores como Bacci y col., 2004 que han descrito una implicación a nivel postsináptico de los receptores CB<sub>1</sub>, como el caso de la regulación autocrina de neuronas neocorticales, las cuales son capaces de producir una autoinhibición de larga duración mediada por eCBs.

La activación directa de los receptores GABA<sub>A</sub> por pulsos de GABA excluye la contribución de los efectos presinápticos asociados a la DSI presente en las respuestas sinápticas. En estas condiciones se induce una potenciación de las corrientes GABA que es exclusivamente postsináptica. En estas condiciones la despolarización induce FID y la subsiguiente potenciación sin que exista la contribución de la DSI y su supresión. Estos resultados avalan la hipótesis de que el componente postsináptico es fundamental para la generación de la GABA<sub>A</sub>-LTP.

La FID es un fenómeno puramente postsináptico, que aparece inmediatamente después de la activación de los M1-mAChRs y que necesita del aumento calcio intracelular para su génesis.

**4. La GABA<sub>A</sub>-LTP es un fenómeno potencialmente fisiológico con importantes consecuencias funcionales.**

La GABA<sub>A</sub>-LTP se induce en condiciones cercanas a las fisiológicas emulando el emulando el ritmo theta del hipocampo en condiciones de fijación de corriente. En la rata el ritmo theta se caracteriza por la generación de ráfagas de potenciales o corrientes de acción repetidas a una frecuencia de 4-10 Hz en las células piramidales y con una frecuencia APs o ACs intra-ráfaga de 20 s<sup>-1</sup> (Jung y col., 1994; Núñez y col., 1987). La similitud de esta actividad con la que se emula en estos experimentos refuerza la idea que la GABA<sub>A</sub>-LTP se puede inducir en condiciones naturales.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. Cuando la célula se encuentra en un estado activado (despolarizada), la activación de los receptores M1-mAChs induce la aparición de un fenómeno plástico, hasta ahora desconocido, la FID, que sostenida en el tiempo genera la potenciación a largo plazo de la sinapsis inhibitoria mediada por receptores GABA<sub>A</sub>.
2. La potenciación de la inhibición es debida a un aumento persistente de la pendiente y a la aparición de rectificación de salida en la relación I/V de las respuestas GABA<sub>A</sub>, indicando un aumento de la conductancia y de la sensibilidad a voltaje del receptor GABA<sub>A</sub>.
3. Los cambios en las propiedades biofísicas de las repuestas GABA<sub>A</sub> inducidas por ACh se acompañan de IPSCs de cinética lenta y sensibilidad a benzodiacepina, sugiriendo un incremento en la sinapsis del número de los receptores procedentes de sitios extrasinápticos.
4. En condiciones control la activación de los receptores CB<sub>1</sub> induce la DSI, que desaparece por la aplicación de ACh, lo que contribuye a la potenciación de la sinapsis inhibitoria, por el aumento resultante de la probabilidad de liberación de GABA.
5. Las interneuronas que dominan la génesis de la GABA<sub>A</sub>-LTP son las CCK<sup>+</sup>.
6. La acción combinada de ACh y Despolarización induce activación de PKA y CamKII y aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular que tiene como consecuencia: (i) los cambios en las propiedades biofísicas de las repuestas GABA<sub>A</sub> inducidas por ACh; (ii) la generación la FID; y (iii) el desplazamiento de receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos hacia la sinapsis.
7. La GABA<sub>A</sub>-LTP es un fenómeno que podría ocurrir en condiciones naturales, fisiológicas, regulando el balance excitación/inhibición necesario para el funcionamiento de los circuitos del hipocampo y actuar como retroalimentación negativa homeostática para el control de excitaciones anormalmente desproporcionadas.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



- Aigner, T.G., 1995. Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 155–160.
- Alger, B.E., Pitler, T.A., Wagner, J.J., Martin, L.A., Morishita, W., Kirov, S.A., Lenz, R.A., 1996. Retrograde signalling in depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 cells. *J. Physiol. (Lond.)* 496 ( Pt 1), 197–209.
- Alkondon, M., Albuquerque, E.X., 1993. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 1455–1473.
- Alkondon, M., Rocha, E.S., Maelicke, A., Albuquerque, E.X., 1996. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. V. alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in olfactory bulb neurons and presynaptic modulation of glutamate release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 1460–1471.
- Allred, M.J., Mulder-Rosi, J., Lingelfelter, S.E., Chen, G., Lüscher, B., 2005. Distinct gamma2 subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABAA receptors and gephyrin. *J. Neurosci.* 25, 594–603.
- Auerbach, J.M., Segal, M., 1996. Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 492 ( Pt 2), 479–493.
- Auger, C., Kondo, S., Marty, A., 1998. Multivesicular release at single functional synaptic sites in cerebellar stellate and basket cells. *J. Neurosci.* 18, 4532–4547.
- Bacci, A., Huguenard, J.R., Prince, D.A., 2004. Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature* 431, 312–316.
- Banks, M.I., Pearce, R.A., 2000. Kinetic differences between synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci.* 20, 937–948.
- Bannai, H., Lévi, S., Schweizer, C., Inoue, T., Launey, T., Racine, V., Sibarita, J.-B., Mikoshiba, K., Triller, A., 2009. Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron* 62, 670–682.
- Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N., Langer, S.Z., 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50, 291–313.
- Belelli, D., Harrison, N.L., Maguire, J., Macdonald, R.L., Walker, M.C., Cope, D.W., 2009. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J. Neurosci.* 29, 12757–12763.
- Benke, D., Mertens, S., Trzeciak, A., Gillessen, D., Mohler, H., 1991. Identification and immunohistochemical mapping of GABAA receptor subtypes containing the delta-subunit in rat brain. *FEBS Lett.* 283, 145–149.
- Bianchi, M.T., Macdonald, R.L., 2002. Slow phases of GABA(A) receptor desensitization: structural determinants and possible relevance for synaptic function. *J. Physiol. (Lond.)* 544, 3–18.
- Birnir, B., Everitt, A.B., Gage, P.W., 1994. Characteristics of GABAA channels in rat dentate gyrus. *J. Membr. Biol.* 142, 93–102.
- Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C., Kaila, K., 2009. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61, 820–838.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39.
- Bliss, T.V., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the

- dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* 232, 331–356.
- Bogdanov, Y., Michels, G., Armstrong-Gold, C., Haydon, P.G., Lindstrom, J., Pangalos, M., Moss, S.J., 2006. Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *EMBO J.* 25, 4381–4389.
- Borde, M., Cazalets, J.R., Buño, W., 1995. Activity-dependent response depression in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 74, 1714–1729.
- Bowery, N.G., 2006. GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol* 6, 37–43.
- Bowery, N.G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J.P., Marshall, F., Raiteri, M., Bonner, T.I., Enna, S.J., 2002. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol. Rev.* 54, 247–264.
- Bradford, H.F., 1995. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 47, 477–511.
- Brandon, N.J., Uren, J.M., Kittler, J.T., Wang, H., Olsen, R., Parker, P.J., Moss, S.J., 1999. Subunit-specific association of protein kinase C and the receptor for activated C kinase with GABA type A receptors. *J. Neurosci.* 19, 9228–9234.
- Brickley, S.G., Mody, I., 2012. Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 73, 23–34.
- Brown, N., Kerby, J., Bonnert, T.P., Whiting, P.J., Wafford, K.A., 2002. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 136, 965–974.
- Buño, W., Jr, Garcia-Sanchez, J.L., Garcia-Austt, E., 1978. Reset of hippocampal rhythmical activities by afferent stimulation. *Brain Res. Bull.* 3, 21–28.
- Bussi eres, N., El Manira, A., 1999. GABA(B) receptor activation inhibits N- and P/Q-type calcium channels in cultured lamprey sensory neurons. *Brain Res.* 847, 175–185.
- Cabezas, C., Bu o, W., 2006. Distinct transmitter release properties determine differences in short-term plasticity at functional and silent synapses. *J. Neurophysiol.* 95, 3024–3034.
- Cachope, R., Mackie, K., Triller, A., O'Brien, J., Pereda, A.E., 2007. Potentiation of electrical and chemical synaptic transmission mediated by endocannabinoids. *Neuron* 56, 1034–1047.
- Castillo, P.E., Chiu, C.Q., Carroll, R.C., 2011. Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 328–338.
- Cea-del Rio, C.A., Lawrence, J.J., Tricoire, L., Erdelyi, F., Szabo, G., McBain, C.J., 2010. M3 muscarinic acetylcholine receptor expression confers differential cholinergic modulation to neurochemically distinct hippocampal basket cell subtypes. *J. Neurosci.* 30, 6011–6024.
- Collin, C., Devane, W.A., Dahl, D., Lee, C.J., Axelrod, J., Alkon, D.L., 1995. Long-term synaptic transformation of hippocampal CA1 gamma-aminobutyric acid synapses and the effect of anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10167–10171.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., McLennan, H., 1983. The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 334, 19–31.
- Cope, D.W., Hughes, S.W., Crunelli, V., 2005. GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J. Neurosci.* 25, 11553–11563.
- Cossart, R., Bernard, C., Ben-Ari, Y., 2005. Multiple facets of GABAergic neurons and

- synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci.* 28, 108–115.
- Craddock, N., Jones, L., Jones, I.R., Kirov, G., Green, E.K., Grozeva, D., Moskvina, V., Nikolov, I., Hamshere, M.L., Vukcevic, D., Caesar, S., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Russell, E., Norton, N., Breen, G., St Clair, D., Collier, D.A., Young, A.H., Ferrier, I.N., Farmer, A., McGuffin, P., Holmans, P.A., Donnelly, P., Owen, M.J., O'Donovan, M.C., 2010. Strong genetic evidence for a selective influence of GABAA receptors on a component of the bipolar disorder phenotype. *Mol. Psychiatry* 15, 146–153.
- Creager, R., Dunwiddie, T., Lynch, G., 1980. Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 299, 409–424.
- Charych, E.I., Liu, F., Moss, S.J., Brandon, N.J., 2009. GABA(A) receptors and their associated proteins: implications in the etiology and treatment of schizophrenia and related disorders. *Neuropharmacology* 57, 481–495.
- Chen, G., van den Pol, A.N., 1998. Presynaptic GABAB autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurosci.* 18, 1913–1922.
- Chesler, M., 2003. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol. Rev.* 83, 1183–1221.
- Chevaleyre, V., Castillo, P.E., 2003. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38, 461–472.
- Chevaleyre, V., Castillo, P.E., 2004. Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron* 43, 871–881.
- Chevaleyre, V., Heifets, B.D., Kaeser, P.S., Südhof, T.C., Purpura, D.P., Castillo, P.E., 2007. Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron* 54, 801–812.
- Chevaleyre, V., Takahashi, K.A., Castillo, P.E., 2006. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 37–76.
- Christie, J.M., Jahr, C.E., 2006. Multivesicular release at Schaffer collateral-CA1 hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 26, 210–216.
- Debanne, D., Guérineau, N.C., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M., 1996. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J. Physiol. (Lond.)* 491 ( Pt 1), 163–176.
- Dobrunz, L.E., Stevens, C.F., 1997. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18, 995–1008.
- Dudar, J.D., 1977. The role of the septal nuclei in the release of acetyl-choline from the rabbit cerebral cortex and dorsal hippocampus and the effect of atropine. *Brain Res.* 129, 237–246.
- Eghbali, M., Curmi, J.P., Birnir, B., Gage, P.W., 1997. Hippocampal GABA(A) channel conductance increased by diazepam. *Nature* 388, 71–75.
- Enna, S.J., 2007. *The GABA Receptors*. Humana Press.
- Enna, S.J., McCarson, K.E., 2006. The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv. Pharmacol.* 54, 1–27.
- Farrant, M., Kaila, K., 2007. The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. *Prog. Brain Res.* 160, 59–87.
- Farrant, M., Nusser, Z., 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 215–229.
- Federico, P., MacVicar, B.A., 1996. Imaging the induction and spread of seizure

- activity in the isolated brain of the guinea pig: the roles of GABA and glutamate receptors. *J. Neurophysiol.* 76, 3471–3492.
- Felten, D.L., Shetty, A., 2009. *Netter's Atlas of Neuroscience: 2e*, 2nd ed. Saunders.
- Fernández de Sevilla, D., Buño, W., 2010. The muscarinic long-term enhancement of NMDA and AMPA receptor-mediated transmission at Schaffer collateral synapses develop through different intracellular mechanisms. *J. Neurosci.* 30, 11032–11042.
- Fernández de Sevilla, D., Núñez, A., Borde, M., Malinow, R., Buño, W., 2008. Cholinergic-mediated IP<sub>3</sub>-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 28, 1469–1478.
- Flórez, J., 2003. *Farmacología Humana*. Elsevier España.
- Frazier, C.J., Rollins, Y.D., Breese, C.R., Leonard, S., Freedman, R., Dunwiddie, T.V., 1998. Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J. Neurosci.* 18, 1187–1195.
- Freund, T.F., 2003. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci.* 26, 489–495.
- Freund, T.F., Katona, I., 2007. Perisomatic inhibition. *Neuron* 56, 33–42.
- Frey, U., Morris, R.G., 1998. Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 21, 181–188.
- Fritschy, J.-M., 2008. Epilepsy, E/I Balance and GABA(A) Receptor Plasticity. *Front Mol Neurosci* 1, 5.
- Fukudome, Y., Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Omori, Y., Fukaya, M., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Watanabe, M., Manabe, T., Kano, M., 2004. Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2682–2692.
- Gale, K., 1992. GABA and epilepsy: basic concepts from preclinical research. *Epilepsia* 33 Suppl 5, S3–12.
- Gaztelu, J.M., Buño, W., Jr, 1982. Septo-hippocampal relationships during EEG theta rhythm. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 54, 375–387.
- Glykys, J., Mody, I., 2007. Activation of GABA<sub>A</sub> receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron* 56, 763–770.
- Green, J.D., Arduini, A.A., 1954. Hippocampal electrical activity in arousal. *J. Neurophysiol.* 17, 533–557.
- Haas, K.F., Macdonald, R.L., 1999. GABA<sub>A</sub> receptor subunit gamma2 and delta subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABA<sub>A</sub> receptor currents in mouse fibroblasts. *J. Physiol. (Lond.)* 514 ( Pt 1), 27–45.
- Hájos, N., Papp, E.C., Acsády, L., Levey, A.I., Freund, T.F., 1998. Distinct interneuron types express m2 muscarinic receptor immunoreactivity on their dendrites or axon terminals in the hippocampus. *Neuroscience* 82, 355–376.
- Hasselmo, 1999. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn. Sci. (Regul. Ed.)* 3, 351–359.
- Hebb, D.O., 2002. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. L. Erlbaum Associates.
- Hefft, S., Jonas, P., 2005. Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat. Neurosci.* 8, 1319–1328.
- Hentschke, M., Wiemann, M., Hentschke, S., Kurth, I., Hermans-Borgmeyer, I., Seidenbecher, T., Jentsch, T.J., Gal, A., Hübner, C.A., 2006. Mice with a

- targeted disruption of the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger AE3 display a reduced seizure threshold. *Mol. Cell. Biol.* 26, 182–191.
- Hill, D.R., 1985. GABAB receptor modulation of adenylate cyclase activity in rat brain slices. *Br. J. Pharmacol.* 84, 249–257.
- Hoffman, D.A., Sprengel, R., Sakmann, B., 2002. Molecular dissection of hippocampal theta-burst pairing potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7740–7745.
- Houston, C.M., Lee, H.H.C., Hosie, A.M., Moss, S.J., Smart, T.G., 2007. Identification of the sites for CaMK-II-dependent phosphorylation of GABA(A) receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 17855–17865.
- Huerta, P.T., Lisman, J.E., 1995. Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron* 15, 1053–1063.
- Jacob, T.C., Moss, S.J., Jurd, R., 2008. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 331–343.
- Jacobson, L.H., Cryan, J.F., 2008. Evaluation of the anxiolytic-like profile of the GABAB receptor positive modulator CGP7930 in rodents. *Neuropharmacology* 54, 854–862.
- Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J.A., Morse, K., Laz, T., Smith, K.E., Nagarathnam, D., Noble, S.A., Branchek, T.A., Gerald, C., 1998. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396, 674–679.
- Jung, M.W., Wiener, S.I., McNaughton, B.L., 1994. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J. Neurosci.* 14, 7347–7356.
- Kaila, K., Voipio, J., 1987. Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature* 330, 163–165.
- Kaila, K., Voipio, J., Paalasmaa, P., Pasternack, M., Deisz, R.A., 1993. The role of bicarbonate in GABAA receptor-mediated IPSPs of rat neocortical neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 464, 273–289.
- Kano, M., Kano, M., Fukunaga, K., Konnerth, A., 1996. Ca(2+)-induced rebound potentiation of gamma-aminobutyric acid-mediated currents requires activation of Ca2+/calmodulin-dependent kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13351–13356.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., Watanabe, M., 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89, 309–380.
- Karbon, E.W., Enna, S.J., 1985. Characterization of the relationship between gamma-aminobutyric acid B agonists and transmitter-coupled cyclic nucleotide-generating systems in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 27, 53–59.
- Karson, M.A., Tang, A.-H., Milner, T.A., Alger, B.E., 2009. Synaptic cross talk between perisomatic-targeting interneuron classes expressing cholecystokinin and parvalbumin in hippocampus. *J. Neurosci.* 29, 4140–4154.
- Katona, I., Sperl gh, B., S k, A., K falvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., Freund, T.F., 1999. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 19, 4544–4558.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher,

- J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A., Bettler, B., 1998. GABAB-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683–687.
- Khiroug, L., Giniatullin, R., Klein, R.C., Fayuk, D., Yakel, J.L., 2003. Functional Mapping and Ca<sup>2+</sup> Regulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Channels in Rat Hippocampal CA1 Neurons. *J. Neurosci.* 23, 9024–9031.
- Kim, J., Alger, B.E., 2001. Random response fluctuations lead to spurious paired-pulse facilitation. *J. Neurosci.* 21, 9608–9618.
- Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C., Alger, B.E., 2002. Activation of Muscarinic Acetylcholine Receptors Enhances the Release of Endogenous Cannabinoids in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 10182–10191.
- Kirkwood, A., Dudek, S.M., Gold, J.T., Aizenman, C.D., Bear, M.F., 1993. Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. *Science* 260, 1518–1521.
- Klausberger, T., Somogyi, P., 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321, 53–57.
- Kullmann, D.M., Ruiz, A., Rusakov, D.M., Scott, R., Semyanov, A., Walker, M.C., 2005. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 87, 33–46.
- Lambert, N.A., Wilson, W.A., 1996. High-threshold Ca<sup>2+</sup> currents in rat hippocampal interneurons and their selective inhibition by activation of GABA(B) receptors. *J. Physiol. (Lond.)* 492 ( Pt 1), 115–127.
- Leil, T.A., Chen, Z.-W., Chang, C.-S.S., Olsen, R.W., 2004. GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J. Neurosci.* 24, 11429–11438.
- Lovinger, D.M., 2008. Presynaptic Modulation by Endocannabinoids, in: Südhof, T.C., Starke, K. (Eds.), *Pharmacology of Neurotransmitter Release, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 435–477.
- Luscher, B., Fuchs, T., Kilpatrick, C.L., 2011. GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70, 385–409.
- Lüscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1997. G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19, 687–695.
- Lydiard, R.B., 2003. The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 3, 21–27.
- Llano, I., Leresche, N., Marty, A., 1991. Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6, 565–574.
- Maccaferri, G., Lacaille, J.-C., 2003. Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications--making things as simple as possible, not simpler. *Trends Neurosci.* 26, 564–571.
- Magee, J.C., Johnston, D., 1997. A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275, 209–213.
- Malleret, G., Haditsch, U., Genoux, D., Jones, M.W., Bliss, T.V., Vanhose, A.M., Weitlauf, C., Kandel, E.R., Winder, D.G., Mansuy, I.M., 2001. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104, 675–686.
- Markram, H., Lübke, J., Frotscher, M., Sakmann, B., 1997. Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275, 213–215.

- Martín, E.D., Araque, A., Buño, W., 2001. Synaptic regulation of the slow  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *J. Neurophysiol.* 86, 2878–2886.
- Martin, L.A., Alger, B.E., 1999. Muscarinic facilitation of the occurrence of depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience* 92, 61–71.
- McDonald, B.J., Amato, A., Connolly, C.N., Benke, D., Moss, S.J., Smart, T.G., 1998. Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat. Neurosci.* 1, 23–28.
- McLean, H.A., Caillard, O., Khazipov, R., Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.L., 1996. Spontaneous release of GABA activates GABAB receptors and controls network activity in the neonatal rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 76, 1036–1046.
- McNaughton, B.L., Barnes, C.A., 1977. Physiological identification and analysis of dentate granule cell responses to stimulation of the medial and lateral perforant pathways in the rat. *J. Comp. Neurol.* 175, 439–454.
- McQuiston, A.R., Madison, D.V., 1999. Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 19, 2887–2896.
- Mihic, S.J., Harris, R.A., 1996. Inhibition of rho1 receptor GABAergic currents by alcohols and volatile anesthetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 411–416.
- Mombereau, C., Kaupmann, K., Froestl, W., Sansig, G., van der Putten, H., Cryan, J.F., 2004. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 29, 1050–1062.
- Morales, M., Hein, K., Vogel, Z., 2008. Hippocampal interneurons co-express transcripts encoding the alpha7 nicotinic receptor subunit and the cannabinoid receptor 1. *Neuroscience* 152, 70–81.
- Murthy, V.N., Sejnowski, T.J., Stevens, C.F., 1997. Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 18, 599–612.
- Nakamura, T., Barbara, J.G., Nakamura, K., Ross, W.N., 1999. Synergistic release of  $\text{Ca}^{2+}$  from IP3-sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials. *Neuron* 24, 727–737.
- Navarrete, M., Araque, A., 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57, 883–893.
- Navarrete, M., Araque, A., 2010. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68, 113–126.
- Neale, E.A., Bowers, L.M., Jia, M., Bateman, K.E., Williamson, L.C., 1999. Botulinum neurotoxin A blocks synaptic vesicle exocytosis but not endocytosis at the nerve terminal. *J. Cell Biol.* 147, 1249–1260.
- Nguyen, P.V., Abel, T., Kandel, E.R., 1994. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265, 1104–1107.
- Núñez, A., García-Austt, E., Buño, W., Jr, 1987. Intracellular theta-rhythm generation in identified hippocampal pyramids. *Brain Res.* 416, 289–300.
- Nusser, Z., Cull-Candy, S., Farrant, M., 1997. Differences in synaptic GABA(A) receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19, 697–709.
- Nusser, Z., Mody, I., 2002. Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J. Neurophysiol.* 87, 2624–2628.
- Olsen, R.W., Sieghart, W., 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of

- subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol. Rev.* 60, 243–260.
- Ormond, J., Woodin, M.A., 2011. Disinhibition-Mediated LTP in the Hippocampus is Synapse Specific. *Front Cell Neurosci* 5, 17.
- Ovsepian, S.V., Anwyl, R., Rowan, M.J., 2004. Endogenous acetylcholine lowers the threshold for long-term potentiation induction in the CA1 area through muscarinic receptor activation: in vivo study. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1267–1275.
- Petsche, H., Stumpf, C., 1960. Topographic and toposcopic study of origin and spread of the regular synchronized arousal pattern in the rabbit. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 12, 589–600.
- Petsche, H., Stumpf, C., Gogolak, G., 1962. [The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 14, 202–211.
- Pitler, T.A., Alger, B.E., 1992. Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurosci.* 12, 4122–4132.
- Poisbeau, P., Cheney, M.C., Browning, M.D., Mody, I., 1999. Modulation of synaptic GABAA receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19, 674–683.
- Potes, C.S., Neto, F.L., Castro-Lopes, J.M., 2006. Administration of baclofen, a gamma-aminobutyric acid type B agonist in the thalamic ventrobasal complex, attenuates allodynia in monoarthritic rats subjected to the ankle-bend test. *J. Neurosci. Res.* 83, 515–523.
- Rannals, M.D., Kapur, J., 2011. Homeostatic strengthening of inhibitory synapses is mediated by the accumulation of GABA(A) receptors. *J. Neurosci.* 31, 17701–17712.
- Ransom, C.B., Wu, Y., Richerson, G.B., 2010. Postdepolarization potentiation of GABAA receptors: a novel mechanism regulating tonic conductance in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 30, 7672–7684.
- Ricci-Tersenghi, F., Minneci, F., Sola, E., Cherubini, E., Maggi, L., 2006. Multivesicular release at developing Schaffer collateral-CA1 synapses: an analytic approach to describe experimental data. *J. Neurophysiol.* 96, 15–26.
- Roberts, D.C., Andrews, M.M., Vickers, G.J., 1996. Baclofen attenuates the reinforcing effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology* 15, 417–423.
- Rodríguez-Moreno, A., Herreras, O., Lerma, J., 1997. Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 19, 893–901.
- Rodríguez-Moreno, A., López-García, J.C., Lerma, J., 2000. Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1293–1298.
- Romero, M.F., Fulton, C.M., Boron, W.F., 2004. The SLC4 family of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters. *Pflugers Arch.* 447, 495–509.
- Rudolph, U., Knoflach, F., 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 10, 685–697.
- Saliba, R.S., Gu, Z., Yan, Z., Moss, S.J., 2009. Blocking L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels with dihydropyridines reduces gamma-aminobutyric acid type A receptor expression and synaptic inhibition. *J. Biol. Chem.* 284, 32544–32550.
- Saxena, N.C., Macdonald, R.L., 1994. Assembly of GABAA receptor subunits: role of the delta subunit. *J. Neurosci.* 14, 7077–7086.



- Schiavo, G., Matteoli, M., Montecucco, C., 2000. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 80, 717–766.
- Schuler, V., Lüscher, C., Blanchet, C., Klix, N., Sansig, G., Klebs, K., Schmutz, M., Heid, J., Gentry, C., Urban, L., Fox, A., Spooren, W., Jaton, A.L., Vigouret, J., Pozza, M., Kelly, P.H., Mosbacher, J., Froestl, W., Käslin, E., Korn, R., Bischoff, S., Kaupmann, K., van der Putten, H., Bettler, B., 2001. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* 31, 47–58.
- Semyanov, A., Walker, M.C., Kullmann, D.M., Silver, R.A., 2004. Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci.* 27, 262–269.
- Shivers, B.D., Killisch, I., Sprengel, R., Sontheimer, H., Köhler, M., Schofield, P.R., Seeburg, P.H., 1989. Two novel GABAA receptor subunits exist in distinct neuronal subpopulations. *Neuron* 3, 327–337.
- Simonds, W.F., 1999. G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 66–73.
- Sjöström, P.J., Turrigiano, G.G., Nelson, S.B., 2001. Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron* 32, 1149–1164.
- Soltesz, I., Roberts, J.D., Takagi, H., Richards, J.G., Mohler, H., Somogyi, P., 1990. Synaptic and Nonsynaptic Localization of Benzodiazepine/GABAA Receptor/Cl<sup>-</sup> Channel Complex Using Monoclonal Antibodies in the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus of the Cat. *Eur. J. Neurosci.* 2, 414–429.
- Somogyi, P., Takagi, H., Richards, J.G., Mohler, H., 1989. Subcellular localization of benzodiazepine/GABAA receptors in the cerebellum of rat, cat, and monkey using monoclonal antibodies. *J. Neurosci.* 9, 2197–2209.
- Südhof, T.C., 2000. The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28, 317–320.
- Szabadics, J., Tamás, G., Soltesz, I., 2007. Different transmitter transients underlie presynaptic cell type specificity of GABAA,slow and GABAA,fast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14831–14836.
- Teyler, T.J., DiScenna, P., 1984. The topological anatomy of the hippocampus: a clue to its function. *Brain Res. Bull.* 12, 711–719.
- Thompson, S.M., Deisz, R.A., Prince, D.A., 1988. Relative contributions of passive equilibrium and active transport to the distribution of chloride in mammalian cortical neurons. *J. Neurophysiol.* 60, 105–124.
- Ueno, S., Bracamontes, J., Zorumski, C., Weiss, D.S., Steinbach, J.H., 1997. Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABAA receptor. *J. Neurosci.* 17, 625–634.
- Unwin, N., 1989. The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron* 3, 665–676.
- Wadiche, J.I., Jahr, C.E., 2001. Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* 32, 301–313.
- Wafford, K.A., Ebert, B., 2006. Gaboxadol--a new awakening in sleep. *Curr Opin Pharmacol* 6, 30–36.
- Wagner, P.G., Dekin, M.S., 1997. cAMP modulates an S-type K<sup>+</sup> channel coupled to GABAB receptors in mammalian respiratory neurons. *Neuroreport* 8, 1667–1670.
- Wallner, M., Hancher, H.J., Olsen, R.W., 2006. Low dose acute alcohol effects on GABA A receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* 112, 513–528.
- Wang, H., Bedford, F.K., Brandon, N.J., Moss, S.J., Olsen, R.W., 1999. GABA(A)-

- receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397, 69–72.
- Wang, Q., Liu, L., Pei, L., Ju, W., Ahmadian, G., Lu, J., Wang, Y., Liu, F., Wang, Y.T., 2003. Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron* 38, 915–928.
- Wei, W., Faria, L.C., Mody, I., 2004. Low ethanol concentrations selectively augment the tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24, 8379–8382.
- White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M., Marshall, F.H., 1998. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396, 679–682.
- Whiting, P.J., 2003. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov. Today* 8, 445–450.
- Wilson, R.I., Nicoll, R.A., 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678–682.
- Wohlfarth, K.M., Bianchi, M.T., Macdonald, R.L., 2002. Enhanced Neurosteroid Potentiation of Ternary GABAARs Containing the  $\Delta$  Subunit. *J. Neurosci.* 22, 1541–1549.
- Wojcik, W.J., Neff, N.H., 1984. gamma-aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain, and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Mol. Pharmacol.* 25, 24–28.
- Wu, J., Lukas, R.J., 2011. Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* 82, 800–807.
- Ymer, S., Schofield, P.R., Draguhn, A., Werner, P., Köhler, M., Seeburg, P.H., 1989. GABAA receptor beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs. *EMBO J.* 8, 1665–1670.
- Zhao, Y., Tzounopoulos, T., 2011. Physiological activation of cholinergic inputs controls associative synaptic plasticity via modulation of endocannabinoid signaling. *J. Neurosci.* 31, 3158–3168.
- Zucker, R.S., 1999. Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 305–313.